FUNKTION, EIGENSCHAFTEN UND REGULATION DER MULTIFUNKTIONALEN CYSTEINSYNTHASE UND EINIGER AM CYSTEINSTOFFWECHSEL BETEILIGTER ENZYME BEIM WACHSTUM VON *CHLORELLA FUSCA* AUF VERSCHIEDENEN SCHWEFELHALTIGEN VERBINDUNGEN

Karl Friedrich Krauss

Diss
München
1984

FUNKTION, EIGENSCHAFTEN UND REGULATION DER MULTIFUNKTIONALEN CYSTEINSYNTHASE UND EINIGER AM CYSTEINSTOFFWECHSEL BETEILIGTER ENZYME BEIM WACHSTUM VON CHLORELLA FUSCA AUF VERSCHIEDENEN SCHWEFELHALTIGEN VERBINDUNGEN

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DES

FACHBEREICHES BIOLOGIE

DER

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT

MÜNCHEN

vorgelegt

von

Karl Friedrich Krauss

aus

Göttingen

1984

1. Berichterstatter : Prof. Dr. A. Schmidt

2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung : 14.11.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. A. Schmidt am Lehrstuhl für allgemeine Botanik des Botanischen Instituts der Universität München angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Schmidt für seine stete Hilfe, die vielen Ratschläge und die anregenden und kritischen Diskussionen.

Herrn Karl Mayer habe ich für die ausgezeichnete Mithilfe, im Besonderen bei der Aufreinigung der Cysteinsynthase, des Gaitonde-Komplexes und der Gaitonde-positiven Verbindungen zu danken.

Frau Ingrid Erdle gebührt für die gute Zusammenarbeit bei den Regulationsversuchen mein besonderer Dank.

Herrn Dr. habil H.-P. Köst sei für die Synthesen einiger Verbindungen besonders gedankt.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen führte Herr Dr. W. Schäfer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durch, dem ich wie Herrn Prof. Dr. H. Scheer für die Bereitstellung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Anlage danken möchte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534927_0026

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.0	EINLEITUNG	1
2.0	MATERIAL und METHODEN	6
2.1	Biologisches Material	6
2.1.1	Chlorella fusca 211-8b	6
	2.1.1.1 Kulturmedium	6
	2.1.1.2 Rohextrakt-Gewinnung	7
2.1.2	Anzucht anderer Organismen	7
2.2	Chemische Nachweisverfahren	9
2.2.1	Chlorophyllbestimmung	9
2.2.2	Proteinbestimmung	10
2.2.3	Aminosäurebestimmung	11
	2.2.3.1 Nachweisverfahren unter neutralen Bedingungen	11
	2.2.3.2 Cystein-Nachweisverfahren unter sauren Bedingungen	12
2.2.4	Thiolbestimmung	13
2.2.5	Schwefelwasserstoffbestimmung	13
2.2.6	Thiocyanatbestimmung	14
2.2.7	Thiosulfatbestimmung	15
2.2.8	Bestimmung von elementarem Schwefel	15
	2.2.8.1 Reaktion zu Methylenblau	15
	2.2.8.2 Reaktion zu Thiocyanat	15
2.2.9	Radioaktivitätsbestimmung	16
2.2.10	Ketogruppennachweis	16
	2.2.10.1 Ketogruppennachweis mit Phenylhydrazin	16
	2.2.10.2 Ketogruppennachweis mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin	17
2.3	Trennverfahren	18
2.3.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	18
2.3.2	Dünnschichtelektrophorese (DE)	19
2.3.3	Trennung mit Trisacryl GF05	19
2.3.4	Trennung mit Dowex 50 WX 8 H^+-Form	20
2.3.5	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	20
2.3.6	Massenspektrometrie (MS)	21
2.3.7	Elementaranalyse	21

Seite

2.4 Extraktions- und Aufreinigungsverfahren 21
2.4.1 Aufreinigung des Gaitonde-Komplexes 21
2.4.1.1 Extraktion des Gaitonde-Komplexes 21
2.4.1.2 Aufreinigung des Gaitonde-Komplexes 22
2.4.2 Gewinnung von elementarem Schwefel 22
2.4.2.1 Extraktion von elementarem Schwefel 22
2.4.2.2 Aufreinigung von elementarem Schwefel 22
2.4.3 Extraktion von Cystein und cysteinhaltigen Substanzen 23

2.5 Enzymteste 23
2.5.1 Cysteinsynthase (E.C. 4.2.99.8) 23
2.5.2 Sulfocysteinsynthase 24
2.5.3 Cysteindesulfhydrasen (E.C. 4.4.1.1) 25
2.5.3.1 L-Cysteindesulfhydrase 25
2.5.3.2 D-Cysteindesulfhydrase 26
2.5.4 Thiosulfatreduktase (E.C. 2.2.8.1.1) 26
2.5.5 Bestimmung von "gebundenem Sulfid" 27
2.5.6 Sulfataktivierung 27
2.5.7 Glutaminsynthetase (E.C. 6.3.1.2) 28
2.5.8 ß-Cyanoalaninsynthetase (E.C. 4.4.1.9) 29
2.5.9 Rhodanese (E.C. 2.8.1.1) 29
2.5.10 Aminosäureoxidasen 30
2.5.10.1 Messung mit der Sauerstoffelektrode 30
2.5.10.2 Messung der gebildeten Ketosäure 30
2.5.11 Triazolylase 31
2.5.12 S-Sulfocysteinlyase 31

2.6 Cysteinsynthase-Aufreinigung 32
2.6.1 Polyminfällung 32
2.6.2 Ammoniumsulfatfällung 32
2.6.3 Gelchromatographie mit Sephadex-G-50; I.Aufreinigung 32
2.6.4 Ionenaustauscherchromatographie mit DEAE-Sephacel 33
2.6.5 Gelfiltration an Sephadex-G-50; II.Aufreinigung 33
2.6.6 Affinitätschromatographie an Affigel-Blue-A 33
2.6.7 Gelchromatographie an Biogel-A 1,5m 33
2.6.8 Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Biogel-A 34

Seite

2.7 Geräte 34

2.8 Chemikalien 34

2.8.1 Schwefelquellen 34
2.8.2 Lösen einiger Verbindungen 35
2.8.3 Chemische Synthesen 36
2.8.3.1 Synthese von Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure 36
2.8.3.2 Synthese des Cystein-DTE-Adduktes 36
2.8.3.3 Synthese von S-Methylcysteinsulfoxid 37
2.8.3.4 Synthese von Glutathionsulfonsäure 37
2.8.3.5 Synthese von Alkylsulfonsäuren 37
2.8.4 Sonstige Chemikalien 37

3.0 ERGEBNISSE und DISKUSSION 39

3.1 Spezifität und Eigenschaften der verwendeten chemischen Nachweisverfahren 39
3.1.1 Allgemeines Verfahren zur Aminosäurebestimmung 39
3.1.2 Thiolbestimmung 45
3.1.3 Schwefelwasserstoffbestimmung 47
3.1.4 Eisenrhodamin-Komplex 50
3.1.5 Ketogruppennachweis 52

3.2 Trenneigenschaften des Geles Trisacryl GF05 53
3.2.1 Elutionseigenschaften 56
3.2.2 pH-Einfluß auf das Trennverhalten 58
3.2.3 Diskussion 58

3.3 Cysteinnachweismethoden 60
3.3.1 Charakterisierung des sauren Ninhydrinnachweises 61
3.3.1.1 Optimierung des Reaktionsansatzes 61
3.3.1.1.1 Inkubationstemperatur und -zeit 61
3.3.1.1.2 Stabilisierung durch Lösungsmittel 61
3.3.1.1.3 Zusammensetzung des Gaitonde-Reagenzes 63
3.3.1.1.4 Verhältnis von Ninhydrin zu Cystein 63
3.3.1.2 Eigenschaften des sauren Ninhydrinnachweises 64
3.3.1.2.1 Spezifität 64
3.3.1.2.2 Hydrolyse der Gaitonde-positiven Cysteinderivate .. 67
3.3.1.2.3 Linearität 68

Seite

3.3.1.2.4 Bestimmung des "molaren Extinktionskoeffizienten" bezüglich Cystein und seiner Derivate 69
3.3.1.2.5 Einfluß von Kationen auf die Komplexbildung 70
3.3.1.2.6 Einfluß von Anionen auf die Komplexbildung 72
3.3.1.2.7 Negative Interferenz 72
3.3.1.3 Aufreinigung des Gaitonde-Komplexes 75
3.3.1.3.1 Optimieren des Extraktionsmittels 75
3.3.1.3.2 Verhalten in der Dünnschichtchromatographie 77
3.3.1.4 Eigenschaften des Gaitonde-Komplexes 78
3.3.1.4.1 Massenspektrometrie 78
3.3.1.4.2 Elementaranalyse 80
3.3.1.4.3 Spektrale Eigenschaften des Gaitonde-Komplexes 81
3.3.1.4.4 Stabilität des Gaitonde-Komplexes bei verschiedenen pH-Werten 82
3.3.1.5 Versuche zum Reaktionsmechanismus 83
3.3.1.5.1 Abspaltung von Kohlendioxid 83
3.3.1.5.2 Abspaltung von Schwefelwasserstoff 83
3.3.1.6 Diskussion und Strukturvorschlag 85
3.3.2 Trennverfahren 102
3.3.2.1 Dünnschichtchromatographie 102
3.3.2.2 Dünnschichtelektrophorese 103
3.3.2.3 Ionenaustauscherchromatographie an Dowex 50 WX 8 .. 103
3.3.3 Enzymatische Cysteinnachweismethoden 104
3.3.3.1 Cysteindesulfhydrasen 104
3.3.3.2 Aminosäureoxidasen 105
3.3.4 Diskussion 106

3.4 Untersuchungen zur Regulation des N- und S-Stoffwechsels 107
3.4.1 Kinetik der Enzymregulation 108
3.4.2 Enzymregulation unter Standardbedingungen 115
3.4.2.1 Wachstum 125
3.4.2.1.1 Wachstum von Chlorella 125
3.4.2.1.2 Wachstum bei Synechococcus 126
3.4.2.2 Sulfataktivierung 126
3.4.2.2.1 Sulfataktivierung bei Chlorella 127
3.4.2.2.2 Sulfataktivierung bei Synechococcus 128

Seite

3.4.2.3 Cysteinsynthase 129
3.4.2.3.1 Cysteinsynthase bei Chlorella 129
3.4.2.3.2 Cysteinsynthase bei Synechococcus 130
3.4.2.4 S-Sulfocysteinsynthase 131
3.4.2.4.1 S-Sulfocysteinsynthase bei Chlorella 131
3.4.2.4.2 S-Sulfocysteinsynthase bei Synechococcus 132
3.4.2.5 L-Cysteindesulfhydrase 132
3.4.2.5.1 L-Cysteindesulfhydrase bei Chlorella 133
3.4.2.6 D-Cysteindesulfhydrase 133
3.4.2.6.1 D-Cysteindesulfhydrase bei Chlorella 133
3.4.2.7 Thiosulfatreduktase 134
3.4.2.7.1 Thiosulfatreduktase bei Chlorella 134
3.4.2.7.2 Thiosulfatreduktase bei Synechococcus 135
3.4.2.8 Glutaminsynthetase 136
3.4.2.8.1 Glutaminsynthetase bei Chlorella 136
3.4.2.8.2 Glutaminsynthetase bei Synechococcus 136
3.4.2.9 "gebundenes Sulfid" 137
3.4.2.9.1 "gebundenes Sulfid" bei Chlorella 137
3.4.2.9.2 "gebundenes Sulfid" bei Synechococcus 138
3.4.3 Regulation unter Kurzzeitbedingungen bei Chlorella 138
3.4.3.1 Wachstum 140
3.4.3.2 Sulfataktivierung 141
3.4.3.3 Cysteinsynthase 141
3.4.3.4 S-Sulfocysteinsynthase 142
3.4.3.5 L-Cysteindesulfhydrase 142
3.4.3.6 D-Cysteindesulfhydrase 142
3.4.3.7 Thiosulfatreduktase 143
3.4.3.8 Glutaminsynthetase 143
3.4.3.9 "Gebundenes Sulfid" 144
3.4.3.10 ß-Cyanoalaninsynthetase 144
3.4.4 Regulation bei anderen Organismen 144
3.4.4.1 Regulation bei Blau- und Rotalgen 144
3.4.4.2 Regulation bei Grünalgen 147
3.4.4.3 Regulation bei Lemna minor 148
3.4.5 Diskussion 150
3.4.5.1 Allgemeine Überlegungen 150
3.4.5.2 Auswahl der Verbindungsklassen 150

Seite

3.4.5.1.2 Einfluß des Mediums 152
3.4.5.1.3 Einfluß von Aufnahme und Metabolismus der Schwefelquellen 153
3.4.5.1.4 Enzymregulation in vivo 154
3.4.5.2 Wachstum, Aufnahme und Metabolismus der S-Quellen . 157
3.4.5.3 Regulation der Sulfataufnahme 163
3.4.5.4 Regulation der ATP-Sulfurylase und APS-Sulfotransferase 164
3.4.5.5 Regulation der Cysteinsynthase 167
3.4.5.6 Regulation der S-Sulfocysteinsynthase 170
3.4.5.7 Regulation der Cysteindesulfhydrasen 171
3.4.5.8 Regulation der Thiosulfatreduktase 173
3.4.5.9 Regulation der Glutaminsynthetase 174
3.4.5.10 Einfluß auf den Gehalt an gebundenem Sulfid 176
3.4.5.11 Regulation der ß-Cyanoalaninsynthetase 177

3.5 Bildung von elementarem Schwefel 177
3.5.1 Bildung und Extraktion des gebundenen Sulfids 178
3.5.2 Aufreinigung 178
3.5.3 Nachweis und Eigenschaften von elementarem schwefel 180
3.5.4 Biochemische Reaktionen 188
3.5.5 Diskussion 192

3.6 Vorkommen, Nachweis und Eigenschaften von Gaitonde-positiven Verbindungen 207
3.6.1 Eigenschaften der Gaitonde-positiven Verbindungen 207
3.6.2 Vorkommen der Gaitonde-positiven Verbindungen 209
3.6.2.1 Chemische Reaktionsprodukte 209
3.6.2.2 In vitro Reaktionsprodukte 209
3.6.2.3 In vivo Reaktionsprodukte 211
3.6.3 Diskussion 212

3.7 Cysteinsynthase aus Chlorella fusca 211-8b 217
3.7.1 Aufreinigung der Cysteinsynthase 217
3.7.1.1 Fällungen 217
3.7.1.1.1 Polyminfällung 217
3.7.1.1.2 Ammoniumsulfatfällung 219
3.7.1.2 Säulentrennungen 219
3.7.1.2.1 Gelchromatographie an Sephadex-G-50 I. Aufreinigung 219
3.7.1.2.2 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel 221
3.7.1.2.3 Gelchromatographie an Sephadex-G-50 II.Aufreinigung 223

Seite

3.7.1.2.4 Affinitätschromatographie an Affigel-Blue-A 224
3.7.1.2.5 Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Biogel-A .. 225
3.7.1.2.6 Gelchromatographie an Biorad-A 1,5m 226
3.7.2 Eigenschaften der Cysteinsynthase 227
3.7.2.1 Proteinabhängigkeit 227
3.7.2.2 pH-Optimum 227
3.7.2.3 Zeitabhängigkeit 229
3.7.2.4 K_m-Werte 230
3.7.2.5 Substratspezifität 234
3.7.2.5.1 Substratspezifität der Cysteinsynthase 234
3.7.2.5.2 Substratspezifität der L-Cysteindesulfhydrase 235
3.7.2.5.3 Substratspezifität der ß-Cyanoalaninsynthetase 235
3.7.2.5.4 Substratspezifität der Austauschreaktion 237
3.7.2.6 Der Einfluß von Pyridoxalphosphat und seiner Hemmstoffe 238
3.7.3 Reaktionsproduktanalyse 239
3.7.3.1 Reaktionsprodukte der Cysteinsynthase 239
3.7.3.2 Stereospezifität der Cysteinsynthase 239
3.7.4 Untersuchungen zur "S-Sulfocysteinsynthase"..... 240
3.7.4.1 Versuche zum Nachweis der "S-Sulfocysteinsynthase" 240
3.7.4.2 Kopplung von Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase 241
3.7.5 Diskussion 243
3.7.5.1 Eigenschaften der untersuchten Enzyme 244
3.7.5.2 Cysteinsynthase, ein multifunktionales Enzym 257
3.7.5.3 "S-Sulfocysteinsynthase" eine zusammengesetzte Enzymaktivität 265

4.0 GESAMTDISKUSSION 269

4.1 Regulation des Cysteinstoffwechsels 269

4.2 Lokalisation der Enzyme des intrazellulären Schwefelstoffwechsels 274

4.3 Der intrazelluläre Schwefelzyklus 278

4.4 Der Cysteinstoffwechsel bei Algen und höheren Pflanzen 281

5.0 ZUSAMMENFASSUNG 290

6.0 LITERATURVERZEICHNIS 293

ABKÜRZUNGEN

An dieser Stelle sollen nur die Abkürzungen aufgeführt werden, die von allgemeiner Bedeutung sind. Ansonsten werden sie direkt in den jeweiligen Legenden erklärt. Die korrekten Namen vieler schwefelhaltigen Substanzen, deren Trivialnamen meist gebracht wurden, können der Tab. 18 entnommen werden.

Ac	Acetat
Ala(CN)	ß-Cyanoalanin
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAL	Dimercaptopropanol
ß-C = ß-CN-Ala	ß-Cyanoalaninsynthetase
Car.	Carrier
CS	Cysteinsynthase
Cys = CySH	Cystein
CySOH	Cysteinsulfensäure
CySSH	Thiocystein
$CySO_2H$	Cysteinsulfinsäure
$CySO_3H$	Cysteinsäure
$CySSO_3H$	S-Sulfocystein
CySSCy	Cystin
CySSSCy	Thiocystin
D-CD	D-Cysteindesulfhydrase
DTE	Dithioerythritol
DTNB	5-Dithio-2-nitrobenzoesäure
DYDA	Diketohydrindyliden-diketohydrinamin
E	Extinktion
ε	molarer Extinktionskoeffizient ($cm^2 \times mol^{-1}$)
eV	Elektronenvolt
$Fe_{red.}$	Ferredoxin reduziert
GS	Glutaminsynthetase
g.S.	gebundenes Sulfid
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert
h	Stunde

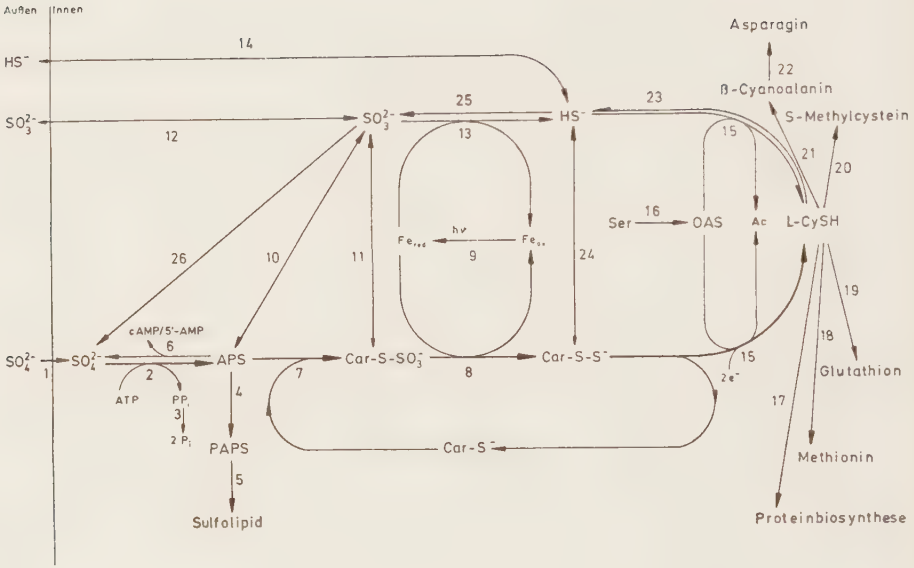
HCySH	Homocystein
λ	Wellenlänge (nm)
L-CD	L-Cysteindesulfhydrase
M	molar (Mol/l); mM = 10^{-3}M; µM = 10^{-6}M; aus praktischen Gründen wurde auf das neue Einheitensystem (mol x l^{-1}) verzichtet.
min.	Minute(n)
mol	x Mol(e); Absolutmenge; mmol = 10^{-3}mol; µmol = 10^{-6}mol; nmol = 10^{-9}mol.
N	normal
OAS	O-Acetylserin
O.D.	optische Dichte
ox.	oxidiert
PAPS	3'-Phospho-adenosin-5'-phosphosulfat
P_i	Phosphat
PP_i	Pyrophosphat
red.	reduziert
S^o	elementarer Schwefel
SA	Sulfataktivierung
SCS	S-Sulfocysteinsynthase
Sdp.	Siedepunkt
Ser	Serin
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäureanion
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSR	Thiosulfatreduktase
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Spannung (Volt)
V (ml)	Volumen
(v/v)	Volumenprozente
(w/v)	Gewichtsprozente

Der Übersichtlichkeit wegen werden alle Organismen, auch die mit deutschem oder englischem Namen, unterstrichen.
Die Nomenklatur der chemischen Verbindungen, besonders in Tab. 18, geschah in Anlehnung an den Fluka-Katalog 1983/4 (Buchs, Schweiz).

1.0 EINLEITUNG

Pflanzen und Bakterien können ihren Bedarf an reduzierten Schwefelverbindungen zum Einbau in Proteine, Coenzyme und Lipide selbst decken, indem sie anorganisches Sulfat in der assimilatorischen Sulfatreduktion (Schema A) bis zum Cystein, der Vorstufe vieler schwefelhaltiger Verbindungen, reduzieren.
Tiere dagegen sind auf die externe Zufuhr von reduzierten Schwefelverbindungen, wie Cystein und Methionin angewiesen, wobei sie letzteres auch über den Schwefeltransfer zu Cystein umwandeln können. Bisher liegen nur wenige Informationen über die Verwertung oxidierter oder reduzierter Schwefelquellen durch Algen und höhere Pflanzen vor (ELLIS 1969).
Daher soll als erstes Ziel der Arbeit, auch im Hinblick auf die praktische Anwendung bei der Abwasserklärung, das Spektrum der Verbindungen ermittelt werden, die von Grünalgen als einziger Schwefelquelle verwertet werden können. Hierzu wählte man die Grünalge Chlorella fusca, sowie in einigen Versuchen zusätzlich die Blaualge Synechococcus 6301 aus, da sie zum einen in der Natur relativ häufig vorkommen, und zum anderen aus Vorversuchen eine große Bandbreite von metabolisierbaren Verbindungen bekannt ist (SCHMIDT et al. 1982). Diese Ergebnisse liefern die Grundlagen für Versuche, die in verschiedene Richtungen führen.
Da sowohl oxidierte und reduzierte Verbindungen, zum Teil auch nicht biogenen Ursprungs, als einzige Schwefelquelle dienen können, müssen Algen über die dazu nötigen Enzyme verfügen. In unserem Labor wird diesem Aspekt von Mitarbeitern speziell für den Sulfonsäure- und Sulfatestermetabolismus nachgegangen. Für die Zielsetzung dieser Arbeit sind dagegen die Daten der Regulation einiger am Schwefel- und Stickstoffstoffwechsel beteiligter Enzyme durch das Wachstum der Algen auf verschiedenen Schwefelquellen von größerer Bedeutung. Somit ergibt sich auch die günstige Gelegenheit, in vivo Hemmstoffe der assimilatorischen Sulfatreduktion zu erfassen, die bei den in vitro Versuchen bisher nicht gefunden wurden.
Die assimilatorische Sulfatreduktion, die bei Tieren fehlt, gliedert sich in drei Reaktionsschritte (Schema A), die aus der Aktivierung des Sulfats, der Reduktion des aktiven Sulfats (APS) und dem Einbau des reduzierten Schwefels in organische Verbindungen besteht, wie sie von SCHMIDT (1979) zusammengestellt worden sind.

1. Die Pflanze nimmt den Schwefel vorwiegend in oxidierter Form als Sulfat aktiv mit der Sulfatpermease (A 1) auf. Dieses muß unter ATP-Verbrauch und Pyrophosphatfreisetzung mit der ATP-Sulfurylase (E.C. 2.7.7.4 ; A 2) zum Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) aktiviert werden. Da diese Reaktion stark endergon ist, liegt das Gleichgewicht auf der Seite des Sulfats, so daß es



Schema A : Der intrazelluläre Schwefelzyklus

nur durch Entfernen seiner Produkte nach rechts verschoben werden kann. Eine Möglichkeit stellt die Spaltung des Pyrophosphates zum anorganischen Phosphat durch die Pyrophosphatase (E.C. 3.6.1.1 ; A 3) dar. Durch die Phosphorylierung des APS mit der APS-Kinase (E.C. 2.7.1.25 ; A 4) kann die APS-Bildung ebenfalls begünstigt werden, wobei 3'-Phospho-adenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) entsteht. Dieses gilt als Vorstufe für Sulfolipide und Sulfatester (A 5). APS kann aber auch wieder Sulfat mit den APS-Sulfatasen und der APS-Cyclase (KÜHLHORN und SCHMIDT 1980 ; A 6) freisetzen.

2. Bei der Reduktion des aktiven Sulfates wird der Sulfatester des APS mit der APS-Sulfotransferase (A 7) auf einen unbekannten reduzierten Carrier übertragen,wobei ein gebundenes Sulfit entsteht. Dieses ist nun seinerseits Substrat der Thiosulfonatreduktase (A 8), wobei das Sulfit bei Chlorella und höheren Pflanzen mit reduziertem Ferredoxin in einem sechs Elektronenschritt zum carriergebundenem Sulfid reduziert wird. Diese Reaktion ist lichtreguliert, da das oxidierte Ferredoxin nur bei der Photosynthese reduziert werden kann (A 9). Sulfit wird aber nicht nur aus der gebundenen Form (TSANG und SCHIFF 1976 ; A 11), sondern auch aus APS direkt mit der APS-Sulfotransferase

(SCHMIDT 1972 ; A 10) freigesetzt. Sulfit kann auch durch Diffusion in die Zelle gelangen (SPEDDING et al. 1980a ; A 12).
Die lichtabhängige Reduktion des Sulfits erfolgt mit der Sulfitreduktase (E.C. 1.8.1.2) (SCHWENN und KEMENA 1984; A 13), wobei Ferredoxin als Coenzym oxidiert wird und freies Sulfid entsteht, das aber auch von außen durch Diffusion in die Zelle gelangt (SPEDDING et al. 1980a ; A 14).

3. Der Einbau des reduzierten Schwefels in organische Verbindungen erfolgt mit der Cysteinsynthase (E.C. 4.2.99.9 ; A 15), die L-Cystein mit O-Acetylserin und freiem sowie carriergebundenem Sulfid bildet. Das Substrat O-Acetylserin dieser Reaktion liefert die Serintransacetylase (E.C. 2.3.1.30 ; A 16), wobei Acetyl-CoA und Serin als Substrate fungieren. Mit der Bildung des Cysteins ist die assimilatorische Sulfatreduktion abgeschlossen.
Cystein nimmt im Schwefelstoffwechsel von Pflanzen eine zentrale Stellung ein. Ein Großteil des über das APS gebildeten Cysteins wird von der Zelle zur Proteinbiosynthese der Enzyme benötigt (A 17), da die freien Thiolgruppen des Cysteins an einer Unzahl von enzymatischen Reaktionen beteiligt sind. Bei Pflanzen und Pilzen kann Cystein mit der γ-Cystathioninsynthetase zu Cystathionin und mit der ß-Cystathioninlyase zu Homocystein und weiter zum Methionin metabolisiert werden (A 18), welches für die Proteinbiosynthese, wie auch die Bildung des Hormons Äthylen, benötigt wird. Für die Glutathionbiosynthese wird ebenfalls Cystein benötigt (A 19). Cystein ist zudem Substrat von Austauschreaktionen, von denen z.B. mit Methanthiol als Substrat, S-Methylcystein entstehen kann (A 20). Auch für den Stickstoffstoffwechsel spielt es eine große Rolle, da es das giftige Cyanidion, welches beim Abbau von Glycin, Histidin oder Glyoxylat entstehen kann, mit der ß-Cyanoalaninsynthetase (E.C. 4.4.19 ; A 21) zu ß-Cyanoalanin umsetzen kann, womit der Stickstoff nach Metabolisierung mit einer Nitrilase (E.C. 4.2.1.65 ; A 22) in Asparagin eingebaut wird, welches beim Aminosäurestoffwechsel von großer Bedeutung ist.

Bei einem Überschuß an reduzierten Verbindungen erhöht die Zelle den Sulfidgehalt, indem bei einigen Pflanzen L-Cystein mit der L-Cysteindesulfhydrase (E.C. 4.4.1.1 ; HARRINGTON und SMITH 1980 ; A 23) unter Pyruvat- und Ammoniumfreisetzung Sulfid liefern kann. Das Sulfid kann aber auch direkt vom Carriersulfid (A 24) freigesetzt werden. Als Zellgift muß es schnell über die Oxidation zum Sulfit (A 25) und weiter zum Sulfat (A 26) aus der Zelle entfernt werden. Somit scheinen Pflanzen einen internen Schwefelkreislauf zu besitzen, der vom Sulfat zum Cystein und wieder zurück zum Sulfat führen kann (RENNENBERG et al. 1982).

Bei dieser zentralen Rolle des Cysteins ist die Cysteinsynthase ein bedeutendes Enzym, so daß deren Eigenschaften und Regulation ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist. Bei Bakterien, wie Escherichia coli (JONES-MORETIMER et al. 1968) und Salmonella (BAPTIST und KREDICH 1977 ; HULANICKA et al. 1979), wird die Cysteinsynthase, wie auch die Enzyme (A 1; A 2;A 13), durch O-Acetyl-L-Serin induziert (SMITH 1980), wobei das Cystein-B-Genprodukt die eigentliche Regulation dieses Enzyms bewirkt (JAGURA-BURZY und KREDICH 1983).
Bei höheren Pflanzen wird die Cysteinsynthase nicht durch O-Acetyl-L-Serin stimuliert (SMITH 1980), wie allgemein eine Regulation auf der Genebene durch Schwefelverbindungen ausgeschlossen wird, da die Cysteinsynthase der Bohne proteasestabil ist (SCHMUTZ et al. 1983). Es ist daher zu klären, ob Chlorella als Grünalge durch O-Acetyl-L-Serin, wie bei Bakterien stimuliert, oder aber, wie bei höheren Pflanzen,nicht beeinflußt wird.
Während diese Fragestellung nur durch in vivo Versuche geklärt werden kann, muß die Cysteinsynthase, um ihre Multifunktionalität nachzuweisen, aufgereinigt werden. SCHMIDT und ERDLE (1983) glauben, die L-Cysteindesulfhydrase als eine Seitenaktivität der Cysteinsynthase bei Chlorella ansprechen zu können, da beide Enzyme bei der Aufreinigung gleiches Verhalten zeigten und nicht getrennt werden konnten. Dieser Ansicht widersprechen HALL und SMITH (1983) mit ihren Untersuchungen an Brassica oleracea, welche zwei getrennte Proteine besitzt.
Auch die ß-Cyanoalaninsynthetase wird als Seitenaktivität der Cysteinsynthase diskutiert, da sie bei der Lupine (HENRICKSON und CONN 1969) und bei Vitia sativa (NIGAM und McCONNELL 1971) identisches Elutionsverhalten bei der Aufreinigung zeigt, wenngleich HENRICKSON und CONN (1969),wegen der unterschiedlichen Molekulargewichte beider Enzymaktivitäten,Zweifel an ihrer Identität anmeldeten. Bei Bakterien, wie Chromobacterium (RODGERS 1982), Escherichia coli (DUNNILL und FOWDEN 1965), Enterobacter (YANASE et al. 1982a,b) und Bacillus megaterium (CASTRIC und CONN 1971) werden beide Aktivitäten von der Cysteinsynthase durchgeführt. Die Austauschreaktion mit Schwefelwasserstoff bei Chlorella (SCHMIDT 1977b), Spinat (SCHMIDT 1977a) und Synechococcus (DIESSNER und SCHMIDT 1981) wird ebenso der Cysteinsynthase zugeschrieben wie auch der Austausch mit Methanthiol bei Spinat (GIOVANELLI und MUDD 1968), Lupine (HENRICKSON und CONN 1969) und Catharanthus (SCHWENN et al. 1983).
Ein nächstes Ziel dieser Arbeit ist es daher, die der Cysteinsynthase zugeschriebene Multifunktionalität durch ihre Aufreinigung und Charakterisierung, sowie durch den Vergleich der Eigenschaften der einzelnen Enzymaktivitäten, nachzuweisen.
Bei Bakterien, wie Pseudomonas, Thiobacillus, Bacillus megaterium, Escherichia coli (CHAMBERS und TRUDINGER 1971), und phototrophen Bakterien,wie Chromatium und Rhodospirillum (HENSEL und TRÜPER 1981, 1983), kann O-Acetylserin mit der

Cysteinsynthase und Thiosulfat zu S-Sulfocystein umgesetzt werden. Da diese Enzymaktivität z.T. mit der Cysteinsynthase bei Pseudomonas (CHAMBERS und TRUDINGER 1971), Chromatium (HENSEL und TRÜPER 1981) und Rhodospirillum (HENSEL und TRÜPER 1983) assoziiert ist, soll ihr Vorkommen bei Algen und höheren Pflanzen näher untersucht werden.

Der Nachweis der S-Sulfocysteinsynthase erfolgt mit dem sauren Ninhydrinreagenz (CHAMBERS und TRUDINGER 1971 ; GAITONDE 1967), welches auch zur Cysteinbestimmung bei der Cysteinsynthase verwendet wird (PIENIAZEK et al. 1973). Da somit keine Trennung von Cystein und Sulfocystein möglich ist, sind zumindest Zweifel an der Existenz der S-Sulfocysteinsynthase angebracht, die durch Vortrennung und Nachweis ihrer Reaktionsprodukte untersucht werden sollten.

Nicht nur der Nachweis von Cystein und einiger Cysteinderivate (UBUKA et al. 1980a) mit dem sauren Ninhydrinreagenz, sondern auch der Einsatz dieser Methode bei der Bestimmung des in vivo Cysteingehaltes (MALLOY et al. 1981) deuten auf eine Unspezifität hin, der nachgegangen werden soll. Es müssen daher Trennmethoden dem Cysteinnachweis vorgeschaltet werden, um mit ihm spezifische Aussagen machen zu können. Obwohl dieses Nachweisreagenz schon seit mehr als 30 Jahren bekannt ist (CHINARD 1952) und zum Cysteinnachweis eingesetzt wird, liegt seine chemische Struktur bis heute im Dunkeln. Deshalb wird versucht, den sogenannten "Gaitonde-Komplex" aufzureinigen und einen Strukturvorschlag zu machen.

Interessante Hinweise auf den Stoffwechsel bestimmter Schwefelquellen werden auch von Untersuchungen erwartet, die die Aufnahme und Metabolisierung der verwendeten Schwefelquellen zum Ziel haben.

Beim Cysteinstoffwechsel müssen bis heute viele Fragen offen bleiben, so daß es Ziel der vorliegenden Arbeit ist, vertiefte Kenntnisse zu folgenden Problemen zu gewinnen :

Es sollen die schwefelhaltigen Verbindungen ermittelt werden, die von Chlorella und Synechococcus als einziger Schwefelquelle verwertet werden können. Außerdem ist ihr Einfluß unter in vivo Bedingungen auf die Regulation des Stickstoff- und Schwefelstoffwechsel von großem Interesse. Die Cysteinsynthase, ein zentrales Enzym des Cysteinstoffwechsels, soll angereichert und charakterisiert werden, um so ihre Multifunktionalität zu überprüfen. Es wird auch versucht, der "S-Sulfocysteinsynthaseaktivität" bei Chlorella nachzugehen. Dies macht eine Charakterisierung und Aufreinigung des dabei verwendeten Cysteinnachweises notwendig. Abschließend erscheint es reizvoll, Verbindungen zu identifizieren, die beim Wachstum auf den Schwefelquellen gebildet werden.

2.0 MATERIAL und METHODEN

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Chlorella fusca 211-8b

2.1.1.1 Kulturmedium

Die meisten Untersuchungen wurden an der Grünalge Chlorella fusca Stamm 211-8b der Algensammlung Göttingen durchgeführt. Dieser Stamm wurde bis vor kurzem zur Art Chlorella pyrenoidosa gerechnet (SCHLÖSSER 1982). Er ist zum einen leicht zu kultivieren und wird zum anderen in unserem Labor seit langem untersucht, so daß sich die eigenen Versuche mit den Beobachtungen früherer und laufender Untersuchungen der Mitarbeiter ergänzen lassen.

Als Grundmedium wurde ein nahezu "schwefelfreies" Schwefelmangelmedium folgender Zusammensetzung (modifiziert nach HODSON et al. 1971) verwendet (in µmol) :

KNO_3 5000; $Mg(NO_3)_2 \times 6\ H_2O$ 2000; KH_2PO_4 500; K_2HPO_4 500; $Ca(NO_3)_2$ 250; Fe/EDTA-Komplex[1] 90; Spurenelemente[2]: H_3BO_3 23; $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$ 44; $Mn(NO_3)_2 \times 6\ H_2O$ 6,3; $ZnCl_2$ 0,37 und $Cu(NO_3)_2 \times 3\ H_2O$ 0,16.
Es wurde mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

1) Fe/EDTA-Komplex : 8,9 g $FeCl_2 \times 4\ H_2O$ und 16,7 g EDTA x 2 H_2O wurden in 500 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde über Nacht begast, gefiltert und der Durchlauf verwendet (1 ml/l Medium).

2) Spurenelemente-Lösung : In 1 l Lösung wurden folgende Mengen eingewogen : H_3BO_3 1,43 g; $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$ 10 mg; $Mn(NO_3)_2 \times 6\ H_2O$ 1,78 g; ZnCl 50 mg; $Cu(NO_3)_2 \times 2\ H_2O$ 38 mg. Das Schwefelmangelmedium erhielt 1 ml dieser Lösung.

Alle Medien wurden bis zu einem Volumen von 1 l 30 min. und bei 10 l 120 min. bei 118°C und 1,18 atm autoklaviert. Etwaige Flüssigkeitsverluste wurden mit sterilem deionisierten Wasser ersetzt.
Sollten die Algen auf einem Sulfatmedium gezogen werden, so wurde dem Schwefelmangelmedium obiger Zusammensetzung Natriumsulfat in einer Endkonzentration von 2×10^{-4}M direkt vor dem Autoklavieren oder danach durch Sterilfiltration zugesetzt. Die Sulfatmenge beträgt ein zehntel der von HODSON et al. (1971) beschriebenen Menge. Die Konzentration der übrigen Schwefelverbindungen, die dem Schwefelmangelmedium bei den Regulationsversuchen (3.4) zugesetzt wurden, betrugen 3×10^{-4} M. Da einige käufliche Verbindungen Verunreinigungen von Sulfat enthielten, mußten sie, wie unter 2.8.1 beschrieben, gereinigt werden.

Eine Chlorella-Stammkultur wurde auf Schrägagar-Röhrchen bei 28°C und Licht gezogen, wobei einem Sulfatmedium noch 2 % (w/v) Agar zugesetzt worden waren. Zum Animpfen der Pirson-Flaschen und der 10 l-Flaschen verwendete man Stammlösungen (70 ml), die in 100 ml Erlenmeyer-Kolben am Rundschüttler (80 upm, 28°C) gezogen wurden.
Die Chlorella-Zellen für die Versuche 3.4 zog man in Pirson-Flaschen (750 ml Medium) in einem Kniese-Kulturapparat bei 27°C und 14000 Lux an. Man impfte sie mit 100 µl Stammlösung, die im Durchschnitt 6 x 10^6 Zellen und 2 µg Chlorophyll enthielten, an.
Für präparative Zwecke (3.5, 3.6 und 3.7) zog man die Algen in bis zu 8 je 10 l-Flaschen, die in einer selbstgebauten Anlage (DIESSNER 1980) mit 7000 Lux beleuchtet wurden, an. Da keine Temperaturregelung erfolgte, betrug die Temperatur oft 32 - 33°C im Medium, so daß die unter diesen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse nicht genau mit denen von in Pirson-Flaschen gezogenen Zellen vergleichbar sind. Jede 10 l-Flasche impfte man mit 30 ml Stammlösung an, die 2 x 10^9 Zellen und 0,6 mg Chlorophyll enthielten. Alle Kulturen wurden nach Passieren eines Wattefilters steril mit Pressluft ohne Zusatz von weiterem Kohlendioxid begast.

2.1.1.2 Rohextrakt-Gewinnung

Die Kulturen wurden nach der angegebenen Zeit, in der Regel nach 5 Tagen Wachstum unter batch-Bedingungen, geerntet. Sodann ermittelte man die optische Dichte bei 680 nm und bestimmte die Zellzahl mit der Neubauer'schen Zählkammer. Die Zellen wurden 15 Minuten in einer Runne-Zentrifuge bei 3000 g abzentrifugiert, mit wenig Aufbrechpuffer, 0,1 M Tris-HCl pH 8,0/0,1 M $MgCl_2$ und 10 mM Mercaptoäthanol, gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 5-fachem Volumen des Frischgewichtes der Algen (w/v) homogen aufgenommen, was zuweilen mit einem Potter geschah. Nach Entnahme eines Aliquots, meist 200 µl, der homogenen Zellen zur Chlorophyllbestimmung (2.2.1), schloß man die Zellen bei 12 000 PSI (= 82,7 x 10^6 PA) mit einer Aminco-French-Press (Silverspring, Maryland, USA) auf und zentrifugierte anschließend für 10 Minuten bei 10 000 g in einer WKF-Zentrifuge. Der Überstand wurde als Rohextrakt (RE) in eine Vielzahl von Testen eingesetzt.

2.1.2 Anzucht anderer Organismen

Einige Versuche, wie 3.4 , wurden auch mit anderen Algen zu Vergleichszwecken durchgeführt. Alle Grünalgen stammen aus der Algensammlung Göttingen (SAG-Nr.) und wurden in dem unter 2.1.1.1 beschriebenen Medium (Schwefelmangelmedium), mit Ausnahme von Chlorella sorokiniana SAG 211-8k (37°C), bei 27°C gezogen,

wobei eine weitere Flasche noch 3 x 10^{-4} M Sulfat enthielt.
Es wurden folgende Grünalgen unter Übernahme der Stammbezeichnung nach SCHLÖSSER (1982) verwendet.

Art	SAG-Nr.	ATCC-Nr.	alter Name
Chlamydomonas reinhardtii	11-32a		
Chlorella fusca	211-11n		Chlorella vulgaris
kessleri	211-11h	11468	Chlorella vulgaris
saccharophila	211-9a		
sorokiniana	211-8k	22521	Chlorella pyrenoidosa
Coeleastrum proboscideum	217-2		
Haematococcus vulgaris	211-1e		Chlorella vulgaris
	211-11c		Chlorella vulgaris
Scenedesmus armatus subalternus	276-4a	30429	Scenedesmus pannonicus
commi	276-4b	30428	Scenedesmus quadricauda
obliquus	276-3a	30580	

Alle Blaualgen bezog man vom Pasteur-Institut, Paris, dessen Stammbezeichnungen (PCC-Nr.) übernommen wurden.
Das Schwefelmangelmedium wies folgende Zusammensetzung nach STANIER et al. (1971) auf (in µmol) :

$NaNO_3$ 17 000; K_2HPO_4 x 3 H_2O 20; $MgCl_2$ x 7 H_2O 300; $CaCl_2$ x 2 H_2O 250; Zitronensäure x H_2O 30; Ammoniumeisen-III-citrat 6 mg; EDTA/$MgCl_2$ je 2,5; Na_2CO_3 400; Spurenelemente[1]: H_3BO_3 46; $MnCl_2$ x 4 H_2O 9,1; $ZnSO_4$ x 7 H_2O 0,77; Na_2MoO_4 x 2 H_2O 1,61; $CuSO_4$ x 5 H_2O 0,32; $Co(NO_3)_2$ x 6 H_2O 0,17.
Es wurde mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

[1] Spurenelemente-Lösung : In 500 ml Lösung wurden folgende Mengen eingewogen : H_3BO_3 1430 mg; $MnCl_2$ x 4 H_2O 905 mg; $ZnSO_4$ x 7 H_2O 111 mg; Na_2MoO_4 x 2 H_2O 195 mg; $CuSO_4$ x 5 H_2O 39,5 mg; $Co(NO_3)_2$ x 6 H_2O 24,7 mg.

Bei Sulfatkulturen ersetzte man das $MgCl_2$ x 7 H_2O durch $MgSO_4$ x 7 H_2O, wobei die Sulfatkonzentration 2 x 10^{-4} M betrug. Die Medien wurden wie für Chlorella autoklaviert (2.1.1.1). Die Zugabe anderer Verbindungen geschah in der dort geschilderten Weise. Mit Ausnahme von Anabaena-Kulturen (30°C) wuchsen die Blaualgen bei 37°C. Besonders eingehend führte man Versuche mit der Blaualge Synechococcus (PCC-Nr. 6301) durch, die mit den Wachstumsdaten von Chlorella verglichen werden.

Es wurden folgende Blaualgen untersucht, wobei die Einteilung nach RIPPKA et al. (1979) erfolgt.

Art	PCC-Nr.	ATCC-Nr.	alter Name
Sektion 1: Synechococcus	6301	27144	Anacystis nidulans
	6312	27167	Anacystis spec.
Gloeobacter	7421	29082	
Sektion 2: Xenococcus	7307	29375	
Sektion 3: Spirulina	6313	29542	
LPP	73110	29407	Plectonema boryanum
	7408	29344	Pseudanabaena catenata
Sektion 4: Anabaena cylindrica	7122	27899	
variabilis	7120	27893	Plectonema
variabilis	6309	29211	
Nostoc	6310	27896	Anabaena spiroides
Calothrix	7101	27914	Tolypothrix tenuis

Die Rotalge Porphyridium purpureum (vormals P. cruentum) wurde nach JONES et al. (1963) und Cyanidium caldarum nach ALLEN (1959) gezogen und von Dr.habil. H.-P. Köst erhalten. Euglena gracilis B wuchs auf dem Medium von GREENBLATT und SCHIFF (1959) und wurde von Dr. R. Kudielka zur Verfügung gestellt. Die Anzucht von Lemna minor nach ERISMANN und FINGER (1968) erfolgte im Labor von Dr. Ch. Brunold (Bern, Schweiz). Aniszellkulturen (undifferenziert und Embryonen) zog Dr. R. Kudielka auf einem B5-Medium nach GRAMBORG et al. (1968) an. Alle Medien wurden sulfatfrei angesetzt, indem man die entsprechenden Nitratsalze verwendete, um später die anderen Verbindungen zusetzen zu können.

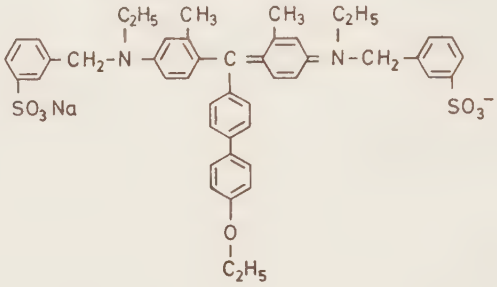
2.2 Chemische Nachweisverfahren

2.2.1 Chlorophyllbestimmung

Es wurden meist 0,2 ml der homogenen Zellsuspension (2.1.2) vor dem French-Pressen entnommen und zweimal mit je 5 ml Methanol bei 80°C für 5 Minuten extrahiert. Danach zentrifugierte man jeweils für 15 Minuten bei 2000 g. Die Überstände wurden vereinigt und auf 10 ml aufgefüllt. Der Chlorophyllgehalt konnte nach Bestimmung der optischen Dichte bei 645 nm und 663 nm mit der von ARNON (1949) bestimmten Formel unter Berücksichtigung der Verdünnung ermittelt werden.

2.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der verwendeten Extrakte war insofern nicht einfach, da sie sowohl Tris-Puffer wie auch Schutzthiole wie DTE enthielten, die das LOWRY-Verfahren oder die Biuret-Reaktion stören. Deshalb wurde der Proteingehalt mit dem BIORAD-protein-assay, der Coomassie-Blau G 250 enthält, bestimmt (BRADFORD 1976 , SEDMAK und GROSSBERG 1977).



(I)

Coomassie-Blau G 250 (Leucoform), nach DIEZEL et al. (1972)

Prinzip

Coomassie-Blau G 250, ein Triphenylmethanderivat (I), liegt in saurer Umgebung, z.B. Phosphorsäure oder Perchlorsäure, als braun-orange gefärbtes Anion (λ_{max} 271 nm, 468 nm und 637 nm) in der Leukoform vor (Abb. $1a_1$). Bei der Reaktion mit Proteinen treten Van-der-Waal'sche Kräfte zwischen der $R\text{-}SO_3^-$-Gruppe des Farbstoffes und der $R\text{-}NH_3^+$-Gruppe der Aminosäuren auf, wobei der Farbstoff nach Blau (λ_{max} 274 nm,466 nm und 648 nm) umschlägt (FAZEKAS et al. 1963; Abb. $1a_2$). Dieser Komplex ist eine Stunde stabil. Da die größte Differenz zwischen beiden Formen bei 597 nm liegt (Abb. 1b), kann der Proteingehalt aus labortechnischen Gründen am Festwellenlängen-Photometer bei 578 nm gegen einen Nullwert ohne Protein bestimmt werden. Chlorophyllhaltige Extrakte (Abb. $1a_2$) beeinflussen den Nachweis nicht, da sie das gleiche Spektrum wie ein ungefärbtes Protein (Abb. $1a_3$) ergeben.

Durchführung

Zu maximal 800 µl Probe, meist 100 µl 1/100 verdünntes Protein und 700 µl Wasser, gab man 200 µl BIORAD-protein-assay, schüttelte kurz durch und bestimmte die Extinktion nach 5 min. Inkubation bei Raumtemperatur bei 578 nm.

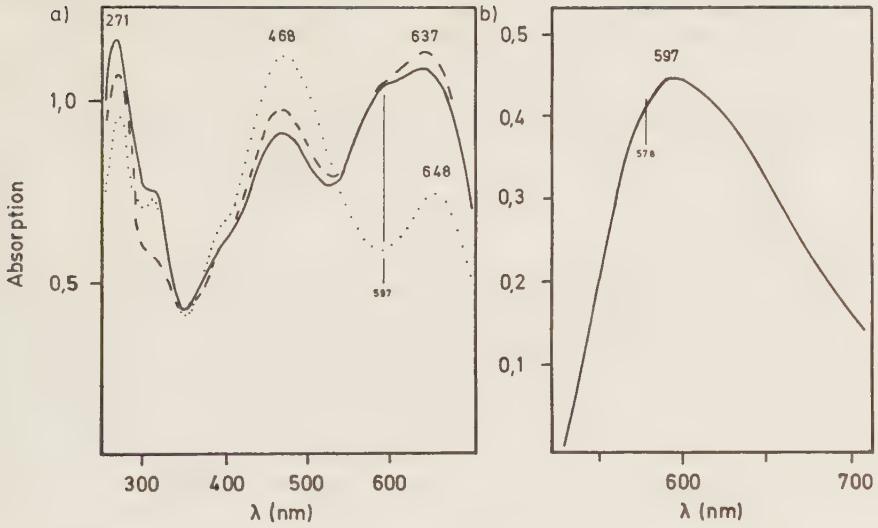


Abb. 1 : Absorptionsspektrum der Proteinbestimmung

a) alle Absorptionsspektren gegen Wasser gemessen

a_1) ..... = Coomassie-Blau G 250 Leucoform; 800 µl Wasser und 200 µl BIORAD-protein-assay.

a_2) —— = Coomassie-Blau G 250-Protein-Komplex; 100 µl 1/100 verdünnter Rohextrakt einer Chlorella-Kultur, die auf Sulfatmedium gewachsen war (23 µg).

a_3) - - - = Coomassie-Blau G 250-Protein-Komplex; 25 µg Rinderseralbumin, gelöst in 800 µl Wasser und 200 µl BIORAD-protein-assay.

b) Absorptionsspektrum des Coomassie Blau G 250-Protein-Komplexes a_2) gegen den Nullwert a_1) gemessen.

Der Test ist im Bereich von 8 µg bis 27 µg linear. Höhere Proteingehalte können nach Vorverdünnung mit Wasser gemessen werden.

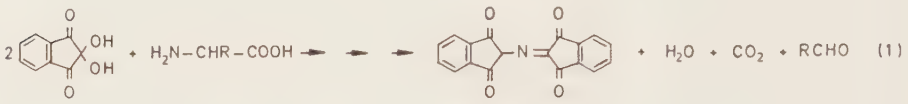
2.2.3 Aminosäurebestimmung

2.2.3.1 Nachweisverfahren unter neutralen Bedingungen

Prinzip

Die meisten Aminosäuren können mit dem üblichen Ninhydrinreagenz quantitativ bestimmt werden (MOORE und STEIN 1948), wobei die α-Aminogruppe mit insgesamt 2 Molen Ninhydrin zu dem blauen Farbkomplex Diketohydrindyliden-diketohydrinamin (λ_{max} 570 nm), welcher als Ruhemann's Purpur bekannt ist, abreagiert

(McCALDIN 1960). Die folgende Reaktionsgleichung (1) faßt die einzelnen Schritte zusammen, welche unter 3.1.1 näher beschrieben werden.



Ninhydrin Aminosäure Ruhemann's Purpur

Durchführung

Man erhitzte 1 ml aminosäurehaltige Probe und 1 ml Ninhydrinreagenz, welches aus 1,25 g Ninhydrin gelöst in 100 ml deionisiertem Wasser (pH 5,0) bestand, für 5 Minuten in kochendem Wasser. Da ein zu langes Erhitzen den Farbkomplex zerstören würde, mußten die Proben sofort gegen einen Nullwert ohne Aminosäuren gemessen werden. Dies geschah im Routineverfahren am Festwellenlängen-Photometer bei 578 nm. Einige Aminosäuren bildeten andersfarbige Komplexe, die bei ihrem Absorptionsmaximum bestimmt wurden (3.1.1 ; Abb. 3).

2.2.3.2 Cystein-Nachweisverfahren unter sauren Bedingungen

Prinzip

Läßt man Aminosäuren mit Ninhydrin unter extrem sauren Bedingungen (pH 0) reagieren, so bildet sich nur mit Cystein und einigen seiner Derivate (GAITONDE 1967) ein roter Farbkomplex (λ_{max} 560 nm,"Gaitonde-Komplex" ; Abb. 2), welcher im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert werden soll (3.3.1). Es wurden die optimalen Standardbedingungen von 3.3.1 (nach GAITONDE 1967 modifiziert) verwendet.

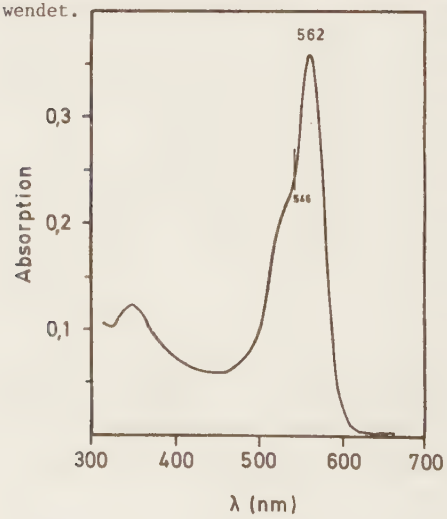


Abb. 2:

Absorptionsspektrum des Gaitonde-Komplex

Zu 100 nmol L-Cystein, gelöst in 1 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, gab man 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2), erhitzte 10 min. bei 100°C, kühlte kurz und gab 2 ml n-Butanol hinzu. Das Spektrum wurde gegen einen Nullwert ohne Cystein gemessen.

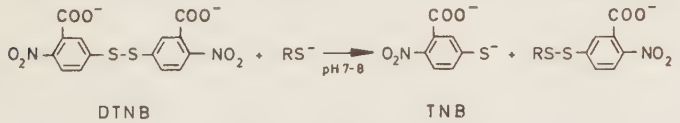
Durchführung

Zu einer cysteinhaltigen Probe gab man 20 µl 0,1 M DTE, um die SH-Gruppe reduziert zu halten. Nach Zugabe von 1 ml "Gaitonde-Reagenz" (1,25 g Ninhydrin gelöst in 20 ml Salzsäure und 80 ml Essigsäure) mischte man kurz und stellte die Proben für 10 Minuten ins kochende Wasserbad, wobei die Gläser mit Glasmurmeln abgedeckt waren. Es bildete sich ein roter Komplex, (λ_{max} 560 nm ; Abb. 2). Um eine vorzeitige Veresterung zu verhindern, fügte man nach kurzem Abkühlen im Eiswasser 2 ml n-Butanol zur Stabilisierung des Farbkomplexes zu (3.3.1.1.2). Die Extinktion der Proben wurde routinemäßig bei 546 nm am Festwellenlängen-Photometer gegen einen cysteinfreien Nullwert gemessen. Da das "Gaitonde-Reagenz" bei längerem Stehen alterte, mußte stets ein Eichwert mit 100 nmol L-Cystein mitgemessen werden. Es sei schon jetzt an die Unspezifität dieses Nachweises erinnert (3.3.1.2.1).

2.2.4 Thiolbestimmung

Prinzip

Alle Thiole, Mercaptane und Mercaptide werden nach der von NASHEF et al. (1977) beschriebenen Methode mit dem Ellman-Reagenz 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, ELLMAN 1959) nachgewiesen. Dieses wird durch Thiole reduktiv gespalten, wobei das gelbe 5-Thio-2-nitrobenzoesäureanion (TNB) mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm freigesetzt wird (Abb. 6; (2)).



DTNB TNB (2)

Durchführung

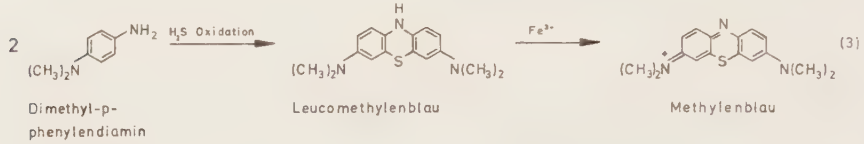
Der Reaktionsansatz enthielt in 1 ml Endvolumen 100 µmol Tris-HCl pH 7,5 und die thiolhaltige Probe. Nach Zugabe von 100 µl 1 mM DTNB-Reagenz, gelöst in Methanol, wurde die Extinktion des gelben TNB-Anions nach einer Wartezeit von 10 Minuten aus labortechnischen Gründen bei 460 nm gegen einen thiolfreien Nullwert gemessen. Der Extinktionskoeffizient ε_{460nm} beträgt 4,7 x 10^6 cm^2 x mol^{-1} ($\varepsilon_{412\ nm}$ = 13,6 x 10^6 cm^2 x mol^{-1}; ELLMAN 1959).

2.2.5 Schwefelwasserstoffbestimmung

Soll die Menge an Schwefelwasserstoff bestimmt werden, so geschieht dies über die Bildung von Methylenblau nach der von SIEGEL (1965) beschriebenen Methode.

Prinzip

Dabei bildet Dimethyl-p-phenylendiamin (p-Aminodimethylanilin) mit Schwefelwasserstoff eine schwefelhaltige Intermediärverbindung, die letztlich in Leukomethylenblau übergeht. Dieses wird dann durch Eisen(III)-Ionen zu Methylenblau oxidiert (λ_{max} 616 nm, 669 nm und 749 nm; PACHMAYR 1960; Abb. 7; (3)).



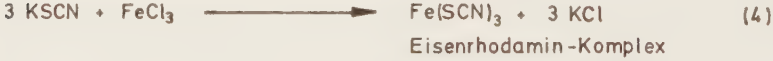
Durchführung

Nach Inkubationsende der Versuche 2.5.3 , 2.5.4 und 2.5.5 wurden die Ansätze, die mit Gummihütchen verschlossen waren, durch Zugabe von 20 µmol Dimethyl-p-phenylendiamin, gelöst in 7,2 N Salzsäure, und anschließend 30 µmol Eisen(III)-chlorid, gelöst in 1,2 N Salzsäure, gestoppt. Nach 20 minütigem Stehenlassen im Dunkeln konnte die Extinktion des Methylenblaus bei 670 nm bzw. 650 nm gegen einen Nullwert ohne Probe bestimmt werden. Die molaren Extinktionskoeffizienten werden stark von den Testbedingungen (3.1.3) beeinflußt, so daß sie bei den einzelnen Enzymtesten gesondert angegeben werden (Tab. 2).

2.2.6 Thiocyanatbestimmung

Prinzip

Thiocyanat reagiert mit Eisen(III)-Ionen zu einem Eisenrhodamin-Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 460 nm liegt (SÖRBO 1957a; (4)).



Durchführung

Chemisch (2.2.7) oder enzymatisch gebildetes Thiocyanat (2.5.9) wurde durch Zugabe von 37 µmol Eisen(III)-chlorid, gelöst in 1 ml 65% Salpetersäure, bei 460 nm gegen einen Nullwert ohne Thiocyanat bestimmt (3.1.4 ; Abb. 8). Der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{460\ nm}$ beträgt 2,53 x 10^6 cm^2 x mol^{-1} (pH 9,0).

2.2.7 Thiosulfatbestimmung

Prinzip

Thiosulfat wird in Gegenwart von Kupfer(II)-chlorid mit Cyanid zu Thiocyanat umgesetzt (SÖRBO 1957a; (5)), welches mit Eisen(III)-chlorid zu dem bekannten Eisenrhodamin-Komplex (2.2.6) abreagiert (4).

$$Na_2S_2O_3 + KCN \longrightarrow KSCN + Na_2SO_3 \qquad (5)$$

$$3\ KSCN + FeCl_3 \longrightarrow Fe(SCN)_3 + 3\ KCl \qquad (4)$$

Eisenrhodamin-Komplex

Durchführung

Zu 2,8 ml Probe wurden 0,5 ml 0,1 M Kaliumcyanid, nach gutem Mixen 0,3 ml 0,1 M Kupfer-(II)-chlorid und dann nach erneutem Mixen 0,5 ml 0,18 M Eisen-(III)-chlorid gegeben. Der rote Eisenrhodamin-Komplex wurde bei 460 nm gegen einen Nullwert ohne Thiosulfat gemessen (3.1.4; Abb. 8).

2.2.8 Bestimmung von elementarem Schwefel

2.2.8.1 Reaktion zu Methylenblau

Prinzip

Gebundenes Sulfid, wie auch elementarer Schwefel, können in Gegenwart von Thiolen wie DTE Schwefelwasserstoff freisetzen, der als Methylenblau nach 2.2.5 bestimmt werden kann (SAKURAI et al. 1982 ; (6)).

$$S^\circ + DTE_{red.} \longrightarrow H_2S + DTE_{ox.} \qquad (6)$$

Durchführung

Der Test enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 100 µmol Tris freie Base, 5 µmol DTE und die nötige Menge an S° oder gebundenem Sulfid, meist 400 µl Methanolextrakt. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei 37°C in gummiverschlossenen Gläsern. Der gebildete Schwefelwasserstoff wurde nach 2.2.5 bei 670 nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{670\ nm}$ beträgt bei diesen Bedingungen $19{,}3 \times 10^6\ cm^2 \times mol^{-1}$.

2.2.8.2 Reaktion zu Thiocyanat

Prinzip

Gebundenes Sulfid wie auch elementarer Schwefel werden nach Zusatz von Cyanid als Thiocyanat nachgewiesen (BARTLETT und SKOOG 1954 ; (7)).

$$S^{o} + CN^{-} \longrightarrow SCN^{-} \qquad (7)$$

Durchführung

Der Test enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 100 µmol Tris-HCl pH 9,0, 20 µmol Kaliumcyanid und die nötige Menge an S^{o} oder gebundenem Sulfid, meist 400 µl Methanolextrakt. Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei 80°C in gummiverschlossenen Gläsern. Das gebildete Thiocyanat wurde mit einer sauren Eisen(III)-chloridlösung (2.2.6) zu dem rotem Eisenrhodamin-Komplex umgesetzt und bei 460 nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{460\ nm}$ beträgt $2{,}53 \times 10^{6}\ cm^{2} \times mol^{-1}$.

2.2.9 Radioaktivitätsbestimmung

Sollten flüssige radioaktive Proben gemessen werden, so gab man zu maximal 200 µl Probe 2 ml Rotiszint-Cocktail (Roth, Karlsruhe) und bestimmte die Radioaktivität im Beckman LS 100 Szintillationszähler über den gesamten ^{14}C-Kanal.

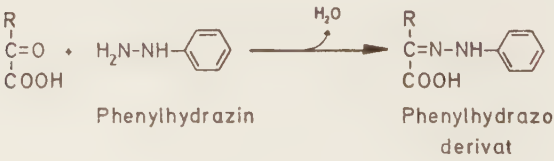
2.2.10 Ketogruppennachweis

Der Nachweis von Ketogruppen kann mit zwei verschiedenen aromatischen Hydrazonderivaten erfolgen, deren Eigenschaften unter 3.1.5 näher abgehandelt werden sollen.

2.2.10.1 Ketogruppennachweis mit Phenylhydrazin

Prinzip

Phenylhydrazin reagiert mit Ketogruppen, wobei sich Phenylhydrazonderivate bilden, die wegen ihrer chemischen Struktur unterschiedliche Absorptionsmaxima aufweisen (8).



(8)

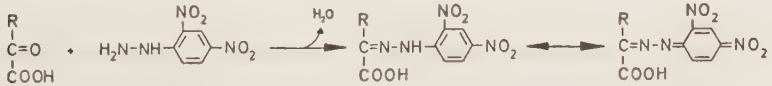
Durchführung

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 90 µmol Tris-HCl pH 8,0, 10 µmol Phenylhydraziniumchlorid und die Ketogruppen-haltige Probe. Da dieser Nachweis speziell für die Bestimmung der Aminosäureoxidasen eingesetzt wurde, mußte bei dem unter 2.5.10.2 beschriebenen Test vor Enzymzugabe ein Nullwert der Autoxidation der Aminosäure gemessen werden, um diesen dann nach 20 Minuten von der enzymatisch gebildeten Ketogruppenmenge bei 324 nm abziehen zu können. Das Pyruvat-Phenylhydrazon besitzt ein $\varepsilon_{324\ nm}$ von 8,4 x 10^6 cm^2 x mol^{-1}.

2.2.10.2 Ketogruppennachweis mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Prinzip

2,4-Dinitrophenylhydrazin reagiert in analoger Weise mit Ketogruppen zu 2,4-Dinitrohydrazonderivaten (9), die durch Basenzusatz eine chinoide Form bilden, deren Absorptionsmaxima bei Monoketosäuren um 370 nm und bei Diketosäuren um 560 nm (KUN und GARCIA-HERNANDEZ 1957) liegen. Die genauen Angaben werden unter 3.1.5. und 3.3.3.2 dargestellt.



(9)

2,4-Dinitrophenyl-hydrazin

2,4-Dinitrophenyl-hydrazonderivat

chinoide Form

R = -H Glyoxylsäure; R = $-CH_3$ Pyruvat; R = $-CH_2-SH$ Mercaptopyruvat;
R = $-CH_2-S-CH_3$ α-Keto-γ-Methiol-Butyrat;

Durchführung

Beim chemischen Nachweis gab man die Probe mit 100 µl Tris-HCl pH 8,5 in einem Endvolumen von 1 ml zusammen. Bei Enzymtesten wurden die Ansätze, wie dort beschrieben (2.5.10.2), 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch Zugabe von 0,3 ml 0,1 % (w/v) 2,4-Dinitrophenylhydrazin, das in 2 N Salzsäure gelöst wurde,und weiterer Inkubation für 15 Minuten bei 37°C. Nach Zugabe von 2,5 ml 1 N Natronlauge wurde die optische Dichte bei 520 nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{520\ nm}$ beträgt 9,73 x 10^6 cm^2 x mol^{-1}.

2.3 Trennverfahren

2.3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Durchführung

Sollten Substanzen dünnschichtchromatographisch aufgetrennt werden, so verwandte man zum einen käufliche zum anderen selbstgezogene Platten. Für analytische Zwecke wurden Kieselgel-60-Platten ohne (Nr. 5721) und mit (Nr. 5715) Fluoreszenzindikator F_{254} und HPTLC-Kieselgel-60-F_{254}-Platten (Nr. 5628) zur schnellen Analyse geringster Proben sowie präparative PSC-Kieselgel-60-F_{254}-Platten (Nr. 13895) der Firma Merck (Darmstadt) benützt.
Selbstgezogene Kieselgel-GF_{254}-Platten wurden mit einem Camag-Streichgerät (Muttenz, Schweiz) hergestellt, indem man 50 g Kieselgel-GF_{254} für analytische Zwecke bei einer Schichtdicke von 0,25 mm und 80 g Kieselgel-GF_{254} für präparative Zwecke mit 0,5 mm Schichtdicke in 100 ml bzw. 140 ml Wasser im Starmix der Firma Braun kurz durchmischte und auf jeweils 4 Glasplatten (20 x 20 mm) verteilte. Nach dem Lufttrocknen wurden die Platten 30 Minuten bei 110°C im Trockenschrank aktiviert.
Vor Gebrauch mußten sie noch oft mit einem etwas polarerem Lösungsmittel als das Trenngemisch vorgewaschen werden. Dabei wurden nur p.a. Lösungsmittel verwendet. Die Platten entwickelte man in Glaskammern, die meist mit Filterpapier ausgeschlagen waren, bei Zimmertemperatur.

Detektion :

Die Trennergebnisse konnten entweder direkt mittels UV-Löschung und Radioaktivitätsmessung oder inderekt nach Ansprühen mit geeigneten Nachweisreagentien sichtbar gemacht werden. UV-löschende Substanzen beobachtete man mit der Camag-Universal-UV-29200-Lampe bei 254 nm oder 366 nm.
Um quantitative Aussagen machen zu können, wurden die Platten im Turner-Fluorometer 111 (Palo Alto, USA) mit dem Camag-T-Scanner und den Filtern 110-810 für den Primärstrahl und 110-823 10 % für den Sekundärstrahl abgefahren und am W & W -Recorder 1100 mit Integrator aufgezeichnet.
Radioaktive Substanzen wurden entweder zur schnellen Detektion mit der Birchhover Radiochromatogram Spark Chamber (Letchwork, Heerts, England) fotographiert oder mit dem Berthold-LB 2031/2730 DC-Scanner II/Autochron (Wildbad) und einem Gasgemisch von Methan/Argon 9/1 gemessen.
Sollten allgemein Aminosäuren sichtbar gemacht werden, so geschah dies durch Ansprühen mit einer 0,5 % äthanolischen Ninhydrinlösung und anschließendes

Erhitzen für 10 Minuten auf 110°C. Es bildeten sich violette Flecke von Ruhemann's Purpur (McCALDIN 1960). Durch Nachsprühen mit einer sauren äthanolischen Kupfernitratlösung (Sigma, Nr. N 0757, St. Luis, USA) konnten sie fixiert werden. Nur ß-Cyanoalanin ergab einen grünen Fleck.
Sollten Cystein und seine Derivate spezifisch nachgewiesen werden, wurde mit einer Gaitonde-Lösung (2.2.3.2), der noch 0,1 M DTE zugesetzt worden waren, gesprüht und ebenfalls unter gleichen Bedingungen verfahren. Es traten rote Flecken bei all den Cystein-Derivaten auf, die auch in Lösung eine positive Reaktion zeigen (3.2.1.2.3).
Elementarer Schwefel konnte mit dem Lipid-Sprühreagenz Rhodamin 6B als roter Punkt auf pinkem Hintergrund sichtbar gemacht werden (POHL et al. 1970). Dazu wurden eine 0,005 % (w/v) Rhodamin-6B-Lösung in Methanol vor dem Sprühen mit einer 2 N Natronlauge 1/1 vermischt und sofort gesprüht.
Eine Natriumazidlösung (3 %, w/v, in 0,1 N Jodlösung) stellte elementaren Schwefel als weißen Fleck auf gelb-braunem Hintergrund dar (DAVIES und THURAISINGHAM 1968).

2.3.2 Dünnschichtelektrophorese (DE)

Die Dünnschichtelektrophorese wurde mit dem Gerät der Firma Camag und einem Netzgerät 493 von ISCO (Lincoln, USA) durchgeführt. Die Proben wurden auf Cellulose-Fertigplatten (Nr. 5716, Merck, Darmstadt) oder Kieselgel-Fertigplatten (Nr. 5721, Merck) aufgetragen. Als Marker diente 1 % Pikrinsäure, die zur Anode wandert. Die Gel-Platten feuchtete man im Camag-Sprühkabinett mit dem Elektrophorese-Puffer, der entweder aus Ameisensäure/Eisessig pH 2 oder 0,16 M Citratpuffer pH 5,8 bestand, an. Die Trennung erfolgte bei konstanter Spannung von 1000 V für 30 - 40 Minuten, wobei die Anfangsleistung 10 - 30 W und -stromstärke 9 - 30 mA betrug. Nach dem Trocknen bei 110°C wurde die Platte mit den entsprechenden Nachweisreagentien , wie unter 2.3.1 beschrieben, entwickelt.

2.3.3 Trennung mit Trisacryl GF05

Alle Trennungen mit dem Gel Trisacryl GF05 (LKB, Bromma, Schweden) wurden in einer Standardsäule (1,4 x 75 cm) durchgeführt, die mit 20 mM Tris-HCl pH 8,0 und einer Durchflußrate von 0,25 ml/Minute äquilibriert worden war. Das Eluat wurde in einer Durchflußküvette bei 254 nm gemessen und in Fraktionen zu 2,5 ml gesammelt.
Konnte eine Substanz mit 500 ml des obigen Puffers nicht eluiert werden,

trug man einen linearen Gradienten von 0 - 2 M Natriumchlorid, gelöst in 20 mM Tris-HCl pH 8,0, auf (200 ml je Mischkammer). Nach Laufende wurde das Salz mit dem obigen Elutionspuffer ausgewaschen.
Bei den Eichungen der Säule (3.2) wurden die Verbindungen, meist 100 µmol, soweit möglich in 1 ml 20 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst. Da dies bei den unter 2.8.2 genannten Verbindungen nicht gelang, verfuhr man in der dort beschriebenen Weise. Der Nachweis der einzelnen Verbindungen geschah mit den üblichen Verfahren, wie sie unter 2.2.3, 2.2.4, 2.2.5 und 2.2.7 beschrieben sind.

2.3.4 Trennung mit Dowex 50 WX 8 H^+-Form

Zu analytischen und semipräparativen Zwecken wählte man folgendes Stufenverfahren :
Das Ionenaustauschergel Dowex 50 WX 8 (100 - 200 mesh) wurde mit 1 N Salzsäure in kleinen Plastiksäulen (0,8 x 4 cm) in die H^+-Form gebracht und anschließend mit Wasser neutral gespült. Nach dem Auftragen der Probe spülte man zweimal mit je 5 ml Wasser, um dann mit dreimal je 5 ml 3 M Ammoniumhydroxid spezifisch gebundene Substanzen eluieren zu können. Die Eluate wurden mit spezifischen Nachweisverfahren ausgetestet.
Die präparative Auftrennung cysteinhaltiger Verbindungen erfolgte in einer Glassäule (0,7 x 10 cm) und mit einem Ammoniumhydroxid-Gradienten von 0 - 1 M (200 ml je Mischkammer) bei einer Pumpleistung von 0,18 ml/Minute. Das Eluat wurde mit einer Durchflußzelle bei 254 nm gemessen und anschließend mit den spezifischen Testen untersucht.

2.3.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei den Versuchen 3.5.2 setzte man die Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu analytischen und präparativen Zwecken ein. Eine stainless-steel-Säule (4,6 x 250 mm; Knauer, Berlin) wurde mit dem Reverse-Phase-Gel µBondapak-C_8 (Merck, Darmstadt) gefüllt und mit Methanol/Wasser 85/15 eluiert. Ein Rheodyne 7120-Einspritzsystem (Latek, Heidelberg) und eine 6000 A Pumpe von Waters (Königstein) mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1,5 ml/Minute kam zum Einsatz. Das Eluat wurde in einer 8 µl Durchflußzelle (1 cm) bei 263 nm gemessen. Der Detektor wurde bei präparativen Säulenläufen mit einem Fraktionssammler verbunden.

2.3.6 Massenspektrometrie (MS)

Massenspektrometrische Untersuchungen (3.2.1.4.1 und 3.5.3) wurden mit dem Varian CH 7A (Darmstadt)-Massenspektrometer verbunden mit dem Datensystem SS-188MS bei 70 eV mittels Direkteinlaß von Prof. Dr. W. Schäfer (Max-Planck-Institut, Martinsried) durchgeführt.

2.3.7 Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden vom Mikroanalysenlabor Beetz (Kronach) durchgeführt. Kohlenstoff und Wasserstoff wurden als Kohlendioxid und Wasser in der Verbrennungsanalyse nach dem auf Lavoisier zurückgehenden Verfahren bestimmt. Der Sauerstoffgehalt wurde direkt durch Verbrennen zu Kohlenmonoxid und anschließende Oxidation zu Kohlendioxid mittels Jod-(V)-oxid ermittelt. Stickstoff bestimmte man mit dem Verbrennungsverfahren von Dumas als molekularen Stickstoff. Bei der Schwefelbestimmung konnte auf das "Bombenrohrverfahren" von Carius verzichtet werden, da keine Halogene enthalten waren. Sie geschah in einem Verbrennungsofen und setzte Schwefel zu Sulfat um, das gravimetrisch ermittelt wurde.

2.4 Extraktions- und Aufreinigungsverfahren

2.4.1 Aufreinigung des Gaitonde-Komplexes

2.4.1.1 Extraktion des Gaitonde-Komplexes

500 ml 1 mM L-Cystein und 500 ml Eisessig/Salzsäuregemisch (4/1; v/v) wurden 10 Minuten bei 100°C erhitzt und anschließend längere Zeit im Eiswasser auf Zimmertemperatur gekühlt. Dann extrahierte man den roten Gaitonde-Komplex durch Zugabe von Diäthyläther im Schütteltrichter. Dabei bildete sich oft eine dunkelrote, metallisch glänzende Interphase, die schwer von der Ätherphase getrennt werden konnte. Beide Phasen wurden mehrmals nachextrahiert. Die Ätherphase vereinigte man und neutralisierte sie mit einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung bis pH 7. Nach der Phasentrennung wurde die Ätherphase am Rotationsverdampfer nach Trocknen über Natrium- bzw. Kalziumchlorid zur Trockene eingeengt. Zur weiteren Aufreinigung nahm man den Rückstand in Chloroform auf.

2.4.1.2 Aufreinigung des Gaitonde-Komplexes

Die so erhaltene Chloroform-Fraktion wurde auf selbstgezogenen Kieselgel-GF_{254}-Dünnschichtplatten (2.3.1) mit 3 hintereinander geschalteten Trennmitteln aufgereinigt.
Im Laufmittel 1 , welches aus Chloroform/Aceton (9/1) bestand (R_f=0,84), wurden die Verunreinigungen, die als UV-löschende Substanzen erkennbar sind, abgetrennt. Die rote Gaitonde-Bande wurde abgekratzt, mit Chloroform eluiert und auf ein kleines Volumen eingeengt. In selber Weise reinigte man den Komplex mit dem Laufmittel 2 Benzol/Diäthyläther (1/1, R_f= 0,68) und anschließend mit dem Laufmittel 3 Chloroform (R_f= 0,75). Bei der letzten Auftrennung wurden die Platten mit Aceton und dann mit Chloroform vorgewaschen. Die so erhaltene Fraktion wurde zur Bestimmung der Eigenschaften (3.3.1.4) verwendet.

2.4.2 Gewinnung von elementarem Schwefel

2.4.2.1 Extraktion von elementarem Schwefel

Elementarer Schwefel wird als sogenanntes "gebundenes Sulfid", wie prinzipiell alle Fraktionen bezeichnet werden, die Schwefelwasserstoff mit DTE freisetzen, aus Chlorella fusca isoliert, die in 10 l Anzuchtflaschen (2.1.1.1) auf einem Schwefelmangelmedium wuchsen, dem 2 $x10^{-4}$ M Natriumsulfat und 3 x 10^{-4} M L-Cysteinäthylester zugesetzt waren. Betrug die optische Dichte der Kulturen, meist nach 4 - 5 Tagen, bei 680 nm 0,6, wurden die Zellen durch Zentrifugation (2.1.1.2) geerntet und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Das gebundene Sulfid wurde mit heißem Methanol 10 Minuten lang bei 80°C extrahiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 5000 g für 10 Minuten extrahierte man den Niederschlag ein zweitesmal in gleicher Weise, vereinigte die Überstände und und engte sie am Rotationsverdampfer zur Trockene ein. Zur Auftrennung an Dünnschichtplatten wurden sie mit Petroläther (Sdp. 40 - 65°C) wieder aufgenommen.

2.4.2.2 Aufreinigung von elementarem Schwefel

Die Petrolätherfraktion wurde auf selbstgezogenen präparativen Kieselgel-GF_{254}-Platten (0,5 mm) im Laufmittel 1 Petroläther/Diäthyläther (99,5/0,5, Tab. 27) aufgetrennt. Gebundenes Sulfid (R_f= 0,84) eluierte man mit heißem Methanol und behandelte es mit dem Laufmittel 2 Aceton/Wasser 1/9 (Tab. 27). Das gebundene Sulfid, welches am Start liegen blieb (R_f= 0), wurde in einem dritten und letzten Aufreinigungsschritt mit Laufmittel 3 Äthylacetat (R_f= 0,86) auf käuf-

lichen PSC-Kieselgel-GF_{254}-Platten behandelt (2.3.1). Diese Platten waren zuvor einmal mit Aceton und dann mit Äthylacetat vorgewaschen worden, um alle polaren Verunreinigungen aus dem Gel zu entfernen. Die so gereinigte Fraktion von gebundenem Sulfid konnte zur Massenspektroskopie (2.3.6), wie auch zu anderen Versuchen eingesetzt werden.

2.4.3 Extraktion von Cystein und cysteinhaltigen Substanzen

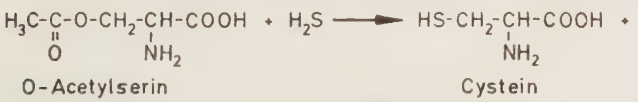
2,5 ml Rohextrakt, der nach 2.1.1.2 hergestellt wurde, und 2,5 ml 0,1 M DTE wurden mit 50 ml 80% Methanol 10 Minuten bei 80°C extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlages für 10 Minuten bei 10 000 g wurde dieser erneut in obiger Weise mit 50 ml 20% Methanol extrahiert. Nachdem man die Überstände vereinigt, auf ein Restvolumen von 1 ml am Rotationsverdampfer bei 50°C eingeengt hatte, fügte man 5 ml Wasser und 6 ml Chloroform hinzu, zentrifugierte für 5 Minuten bei 3000 g und engte die obere Wasserphase auf 1 ml ein. Diese cysteinhaltige Fraktion wurde auf eine Dowex 50 WX 8 (Cl^--Form)-Säule gegeben und mit 3 M Ammoniumhydroxid eluiert(2.3.4). Die Ammoniumhydroxidfraktion wurde zur Trockene eingeengt und anschließend an einer Trisacryl GF 05-Säule (2.3.1) aufgetrennt.

2.5 Enzymteste

2.5.1 Cysteinsynthase (E.C. 4.2.99.8)

Prinzip

In vivo führt die Cysteinsynthase zur Bildung von Cystein, wobei ein gebundenes Sulfid der Sulfatreduktion mit einem Akzeptor, der sowohl O-Acetylserin wie auch Phosphoserin sein könnte, reagiert. In vitro wird dieses Enzym in einer Artefaktreaktion von Natriumsulfid und O-Acetylserin zu Cystein bestimmt, welches mit dem sauren Ninhydrinreagenz (2.2.3.2) nachweisbar ist (10).



(10)

O-Acetylserin Cystein

Durchführung

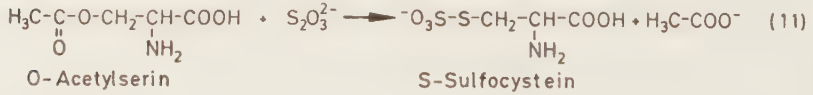
Die Cysteinsynthase wurde nach PIENIAZEK et al. (1973) gemessen.
Der Enzymansatz enthielt 100 µmol Tris-HCl pH 7,5; 3 µmol DTE; 5 µmol Na_2S; 5 µmol O-Acetyl-L-Serin und Enzym in einem Gesamtvolumen von 1 ml.

Der Versuchsansatz wurde durch Zugabe von OAS gestartet und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei die Reagenzgläser mit Glasmurmeln verschlossen wurden. Das gebildete Cystein wurde durch Zugabe von 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2) gegen einen Nullwert ohne Enzym bei 546 nm gemessen. Zudem setzte man stets einen Test ohne OAS an, um die Eigenextinktion der Enzymfraktion von der des Testes abziehen zu können. Zudem wurde stets ein Eichwert pro Versuchreihe mit 100 nmol L-Cystein angesetzt, der eine Extinktion bei 546 nm von 0,25 - 0,33, je nach Alter des Gaitonde-Reagenzes, ergab. Das gebildete Cystein konnte über diesen Eichwert berechnet werden.
Traten zu hohe Extinktionen auf, die über dem Eichbereich lagen, so mußte das Enzym mit 20 mM Tris-HCl pH 7,5 verdünnt werden. Beim Ansetzen der Lösungen war zu beachten, daß sich O-Acetylserin unter alkalischen Bedingungen (ab pH 8,0) leicht zu N-Acetylserin umlagert (FLAVIN und SLAUGHTER 1965), welches mit der Cysteinsynthase nicht reagieren kann. OAS wurde deshalb stets in deionisiertem Wasser gelöst. Die Na_2S-Lösung wurde angesetzt, indem man einen Sulfidkristall mit Wasser spülte, abtrocknete, im Mörser zerkleinerte und die benötigte Menge in 20 mM Tris-HCl pH 7,5 löste, um ein Entweichen von Schwefelwasserstoff unter neutralen oder sauren Bedingungen zu verhindern.

2.5.2 Sulfocysteinsynthase

Prinzip

Die Sulfocysteinsynthase, die bisher nur aus Prokaryonten bekannt ist, wurde in einer der Cysteinsynthase analogen Reaktion gemessen, wobei Thiosulfat mit O-Acetylserin zu Sulfocystein reagiert (11), welches auch mit dem sauren Ninhydrin-Reagenz (2.2.3.2) nachgewiesen werden kann.



(11)

Durchführung

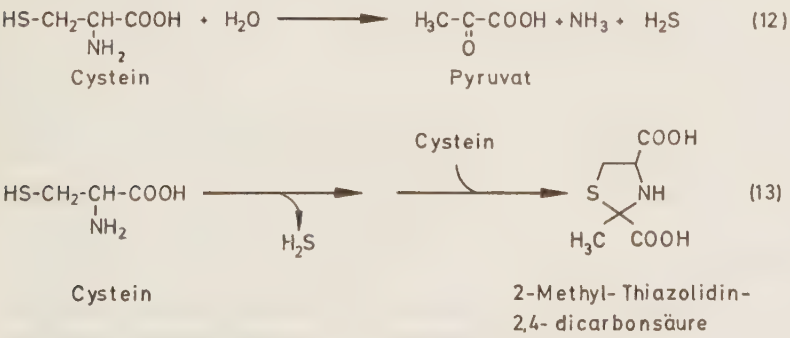
Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 100 µmol Tris-HCl pH 7,5; 3 µmol DTE; 2 µmol Natrioumthiosulfat; 5 µmol O-Acetyl-L-Serin (OAS) und Enzym . Nach dem Start mit O-Acetylserin inkubierte man 30 Minuten bei 37°C, wobei die Reagenzgläser mit Glasmurmeln bedeckt wurden. Das gebildete S-Sulfocystein konnte auch mit dem Gaitonde-Reagenz nachgewiesen werden (3.3.1.2.1). Auch hier war ein Ansatz ohne das Substrat O-Acetylserin nötig,

um die Eigenextinktion jeder Enzymprobe abziehen zu können. Aus Kostengründen wurde auf eine Eichung mit S-Sulfocystein verzichtet und die Eichung von Cystein zur Berechnung der Werte herangezogen, zumal annähernd gleiche Extinktionen beobachtet wurden (3.3.1.4.3).

2.5.3 Cysteindesulfhydrasen (E.C. 4.4.1.1)

Prinzip

Beim Abbau von Cystein sind Desulfhydrasen bekannt, die Schwefelwasserstoff freisetzen, welches als Methylenblau bestimmt werden kann. Über die anderen Reaktionsprodukte, die bei unserem Test der Cysteindesulfhydrasen von Chlorella entstehen, liegen keine Ergebnisse aus der Literatur vor, so daß 2 Reaktionswege denkbar sind, auf die in dieser Arbeit noch näher eingegangen werden soll (3.3.3 und 3.7.5.3).
Der Reaktionsweg (12) setzt nur Schwefelwasserstoff, Ammoniak und Pyruvat frei, während der Reaktionsweg (13) 2 Cysteinmoleküle zu Schwefelwasserstoff, Ammoniak und 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure umsetzt (KREDICH et al. 1973).
Es sind L- und D-Cysteindesulfhydrasen bekannt, die auch getrennt bestimmt werden sollen.



2.5.3.1 L-Cysteindesulfhydrase

Durchführung

Die L-Cysteindesulfhydrase wurde nach SCHMIDT und ERDLE (1983) bestimmt.
Der Ansatz enthielt 100 µmol Tris freie Base; 2 µmol DTE; 800 nmol L-Cystein und Enzym in einem Gesamtvolumen von 1 ml.
Der Ansatz wurde mit L-Cystein gestartet und mit Gummikappen verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 Minuten. Der gebildete Schwefelwasserstoff

wurde nach SIEGEL (1965),wie unter 2.2.5 beschrieben,bei 670 nm gegen einen Nullwert ohne Enzym bestimmt. Zudem war es nötig, einen Kontrolltest ohne L-Cystein durchzuführen, um die Ergebnisse um einen internen Cysteinpool korrigieren zu können. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt $\varepsilon_{670\ nm}$ 28,5 x 10^6 cm^2 x mol^{-1}.

2.5.3.2 D-Cysteindesulfhydrase

Durchführung

Die D-Cysteindesulfhydrase wurde in analoger Weise ermittelt.
Der Ansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 100 µmol Tris-HCl pH 9,0; 2 µmol DTE; 800 nmol D-Cystein und Enzym. Nach dem Start mit Thiosulfat wurden die Gläser mit Gummikappen verschlossen und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der gebildete Schwefelwasserstoff wurde, wie unter 2.2.5 beschrieben, als Methylenblau bei 670 nm gegen einen Nullwert ohne Enzym bestimmt. Es war der gleiche Kontrolltest wie bei 2.5.3.1 nötig. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt $\varepsilon_{670\ nm}$ 28,5 x 10^6 cm^2 x mol^{-1}.

2.5.4 Thiosulfatreduktase (E.C. 2.2.8.1.1)

Prinzip

Die Thiosulfatreduktase setzt aus Thiosulfat in Gegenwart von DTE Sulfit und Schwefelwasserstoff frei, welcher als Methylenblau bestimmt werden kann (14).

$$S_2O_3^{2-} + DTE_{red.} \longrightarrow SO_3^{2-} + S^{2-} + DTE_{ox.} \qquad (14)$$

Durchführung

Die Thiosulfatreduktase wurde in einem Enzymansatz mit 1 ml Endvolumen mit 100 µmol Tris-HCl pH 9,0; 2 µmol DTE; 200 nmol Natriumthiosulfat und Enzym gemessen.
Nach dem Start mit Thiosulfat wurden die Gläser mit Gummikappen verschlossen und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der gebildete Schwefelwasserstoff wurde,wie unter 2.2.5 beschrieben,als Methylenblau bei 670 nm gegen einen Nullwert ohne Enzym bestimmt. Ein Kontrolltest ohne Enzym war auch nötig, um die Enzymwerte um den Gehalt an methylenblau-bildenden Substanzen korrigieren zu können. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt $\varepsilon_{670\ nm}$ 12 x 10^6 cm^2 x mol^{-1}.

2.5.5 Bestimmung von "gebundenem Sulfid"

Prinzip

Der Niederschlag, der bei der Methanolextraktion der Chlorophyllbestimmung anfiel, enthält "gebundenes Sulfid", welches in Gegenwart von DTE Schwefelwasserstoff freisetzt, der als Methylenblau bestimmt werden kann (15).

$$R\text{-}SH + DTE_{red.} \longrightarrow R + H_2S + DTE_{ox.} \qquad (15)$$

Durchführung

Der Methanolniederschlag von 2.2.1 wurde in 1 ml Wasser und 20 µl 0,1 M DTE aufgenommen und 20 Minuten im Dunkeln in mit Gummistopfen verschlossenen Gläsern inkubiert. Der gebildete Schwefelwasserstoff wurde nach SIEGEL (1965) (2.2.5) als Methylenblau, aber nicht bei 670 nm, sondern bei 650 nm gemessen, da sich die Absorptionsspektren von Chlorophyll und Methylenblau bei 670 nm überschneiden (Abb. 7b ; GOLDBECK und SAN PIETRO 1976). Der molare Extinktionskoeffizient beträgt $\varepsilon_{650\ nm}$ $9{,}66 \times 10^6\ cm^2 \times mol^{-1}$.
Spätere Untersuchungen zeigten, daß Methylenblau bei 746 nm ein weiteres Absorptionsmaximum hat, welches bei der Methylenblaubestimmung geeigneter ist, da in diesem Bereich keine Chlorophyllabsorption auftritt (Abb. 7b ; 3.1.3). Der Einheitlichkeit wegen wurde aber trotzdem bei der Erstellung der Tab. 18 bei 650 nm gemessen.

2.5.6 Sulfataktivierung

Prinzip

Um die Gesamtverhältnisse der Sulfataktivierung zu erfassen, bestimmte man die ATP-Sulfurylase (16) und die APS-Sulfotransferase (17) zusammen, indem man (^{35}S)-Sulfat und ATP enzymatisch zu säurelabiler Radioaktivität mit DTE als künstlichem Akzeptor umgesetzt (SCHMIDT 1975a).

$$SO_4^{2-} + ATP \longrightarrow APS + PP_i \qquad (16)$$

$$APS + DTE_{red.} \longrightarrow 5'\text{-}AMP + SO_3^{2-} + DTE_{ox.} \qquad (17)$$

Durchführung

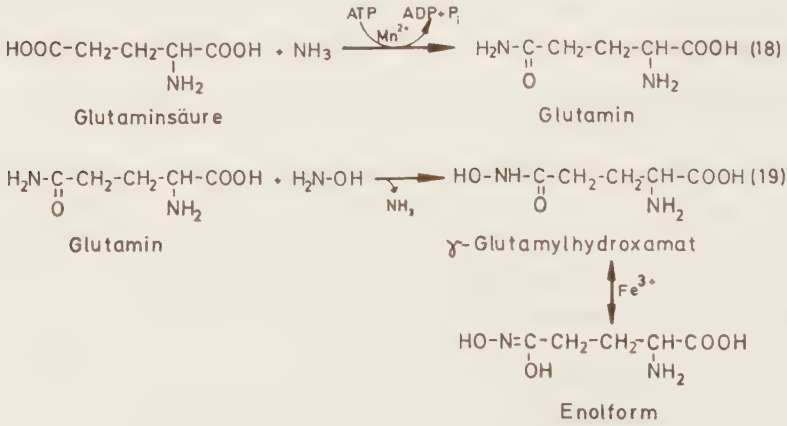
Der Testansatz enthielt 100 µmol Tris-HCl pH 8,5; 10 µmol $MgCl_2$; 6 µmol 5'-ATP; 10 µmol DTE; 2 µmol (^{35}S)-Na_2SO_4 (1000 ipm/nmol) und Enzym in 1 ml Endvolumen. Die Reagenzgläser wurden mit Gummistopfen verschlossen, mit Stickstoff begast

und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Reaktionsende gab man noch 100 µmol Natriumsulfit zu und überführte die Ansätze in Conway-Destillationsschälchen. Nach dem Ansäuern mit 0,5 ml 1 N Salzsäure wurde das gebildete (^{35}S)-Sulfit als (^{35}S)-Schwefeldioxid ausgetrieben und in 1 ml 1 M Triäthylaminpuffer gesammelt und nach 4 Stunden im Szintillationszähler gemessen (2.2.9).
Zudem war es nötig, einen Nullwert ohne Enzym zu messen, um die Verunreinigung von (^{35}S)-Sulfit im eingesetzten (^{35}S)-Sulfat zu ermitteln und von den Testwerten abzuziehen. Die absoluten Mengen an (^{35}S)-Sulfit konnten über die spezifische Aktivität des eingesetzten (^{35}S)-Sulfates bestimmt werden.

2.5.7 Glutaminsynthetase (E.C. 6.3.1.2)

Prinzip

In vivo setzt die Glutaminsynthetase Glutamat und Ammoniak zu Glutamin um (18). Dabei wird ein Mol ATP verbraucht, was aber nur in Gegenwart von Magnesiumionen möglich ist. Da die Messung der Reaktionsprodukte relativ aufwendig ist, verwendete man den Transferasetest (FERGUSON und SIMS 1971), der Hydroxylamin mit Glutamin reagieren läßt, wobei γ-Glutamylhydroxamat entsteht (19), welches durch Eisen(III)-Ionen zur gefärbten Enolform umgewandelt wird.



Durchführung

Der Testansatz enthielt 1000 µmol Tris freie Base; 140 µmol L-Glutamin; 9 µmol Manganchlorid; 35 µmol Hydroxylamin; 1,5 µmol ADP; 35 µmol Na_2HAsO_4 x 7 H_2O und Enzym in 1 ml Endvolumen. Die Chemikalien wurden mit Eisessig zuvor als Mix auf pH 6,4 titriert. Der Test wurde durch Zugabe des Arsenates ge-

startet. Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 1 ml 0,1 M Eisen(III)-chloridlösung in 0,2 N Salzsäure, die 0,25 M Trichloressigsäure enthielt, wurde der Farbkomplex bei 500 nm gegen einen Nullwert ohne Enzym gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{500\ nm}$ beträgt 0,8 x 10^6 cm^2 x mol^{-1}.

2.5.8 ß-Cyanoalaninsynthetase (E.C. 4.4.1.9)

Prinzip

Die ß-Cyanoalaninsynthetase spaltet in Gegenwart von Cyanidionen Schwefelwasserstoff von Cystein ab, wobei ß-Cyanoalanin entsteht (20). Der gebildete Schwefelwasserstoff wird nach 2.2.5 bestimmt.

(20)

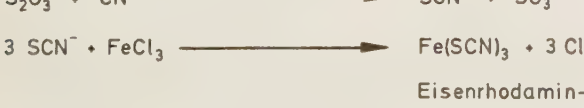
Durchführung

Das Enzym wurde mit 100 µmol Tris freie Base; 1 µmol Kaliumcyanid; 800 nmol L-Cystein und Enzym in einem Endvolumen von 1 ml gemessen. Der Ansatz wurde mit L-Cystein gestartet und mit Gummikappen verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 Minuten. Der gebildete Schwefelwasserstoff wurde nach SIEGEL (1965), wie unter 2.2.5 beschrieben, bei 670 nm gegen einen Nullwert ohne Enzym bestimmt. Zudem war ein Nullwert ohne L-Cystein nötig, um interne Cysteinmengen abziehen zu können. Der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{670\ nm}$ beträgt 16,9 x 10^6 cm^2 x mol^{-1}.

2.5.9 Rhodanese (E.C. 2.8.1.1)

Prinzip

Die Rhodanese katalysiert den Schwefeltransfer von einem S-Donor, meist Thiosulfat, auf einen nukleophilen Akzeptor, meist Cyanid (21). Das gebildete Thiocyanat wurde mit Eisen(III)-chlorid zu einem Eisenrhodamin-Komplex umgesetzt (4). Für diese Reaktion sind auch andere Donatoren und Akzeptoren bekannt.



(21)

(4)

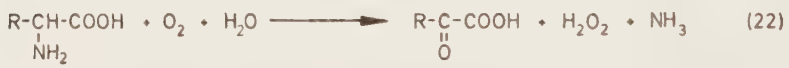
Durchführung

Das Enzym wurde mit 100 µmol Tris-HCl pH 8,0; 20 µmol Natriumthiosulfat; 10 µmol Kaliumcyanid und Enzym in einem Endvolumen von 1 ml gemessen. Nach dem Start mit Cyanid wurden die Ansätze mit Gummikappen verschlossen und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Das gebildete Thiocyanat wurde nach 2.2.6 gegen einen Nullwert ohne Thiocyanat bestimmt.

2.5.10 Aminosäureoxidasen

Prinzip

Aminosäuren werden von L- und D-spezifischen Aminosäureoxidasen unter Sauerstoffverbrauch zu Ammoniak und einer Ketosäure umgesetzt (22). Die spezifische Aktivität dieser Enzyme kann entweder als Sauerstoffverbrauch an einer Sauerstoffelektrode (2.5.10.1) oder über die gebildeten Ketosäuren ermittelt werden (2.5.10.2).



(22)

2.5.10.1 Messung mit der Sauerstoffelektrode

Durchführung

Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 90 µmol Tris-HCl pH 8,0; 40 µmol Aminosäure (außer 10 µmol S-Sulfocystein) und Aminosäureoxidase (L-Aminosäureoxidase aus Schlangenserum 50 µg , Boehringer Nr. 102792 ; D-Aminosäureoxidase aus Schweinenieren 10 µg Boehringer Nr. 102776). Inkubation bei 27°C. Die Proben wurden mit Luftdurchperlen sauerstoffgesättigt (bei Luftdruck 750 mm, 8ppm = 8 µmol/l). Die Messung geschah an einer Sauerstoffelektrode Typ Clark. Vor Enzymzugabe wurde der Sauerstoffverbrauch des Reaktionsansatzes einige Minuten aufgezeichnet, um die Autoxidation der Aminosäure ermitteln zu können. Nach Enzymzugabe wurde der Sauerstoffverbrauch des Enzyms bis zum Reaktionsende verfolgt.

2.5.10.2 Messung der gebildeten Ketosäure

Durchführung

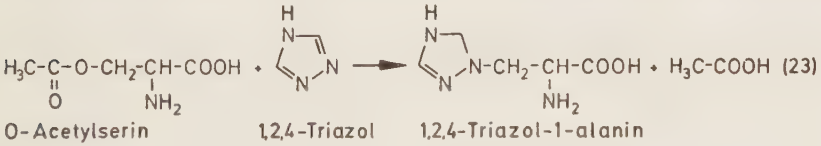
Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 90 µmol Tris-HCl pH 8,0; 40 µmol Aminosäure; 10 µmol Phenylhydrazoniumchlorid und Aminosäureoxidase

(L-Aminosäureoxidase aus Schlangenserum 50 µg, Boeringer Nr. 102792; D-Aminosäureoxidase 10 µg, Boeringer Nr. 102776). Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Vor Enzymzugabe bestimmte man die Extinktion der Autoxidation bei 324 nm. Nach Zugabe ermittelte man die Extinktion nach einer 20 minütigen Inkubation.

2.5.11 Triazolylase

Prinzip

1,2,4-Triazol kann mit der Cysteinsynthase und O-Acetylserin zu 1,2,4-Triazol-1-alanin umgesetzt werden (KREDICH et al. 1975; (28)). Dieses Reaktionsprodukt kann nur dann mit dem neutralen Ninhydrinreagenz (2.2.3.1) nachgewiesen werden, wenn das Substrat O-Acetylserin zerstört worden ist. Dazu macht man sich die 1,3-Acylwanderung bei höheren pH-Werten ab pH 7,6 (3.7.5.1) zunutze, wobei die Aminogruppe des N-Acetylserins nicht mehr mit dem Ninhydrinreagenz reagieren kann.



(23)

Durchführung

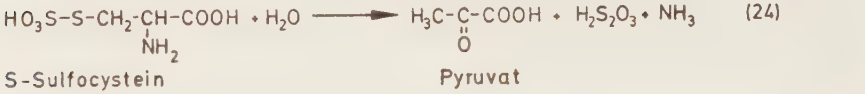
Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 100 µmol Tris-HCl pH 7,5; 20 µmol Triazol; 5 µmol O-Acetyl-L-Serin; 100 nmol EDTA und die angereicherte Enzymfraktion (Abb. 38; 178 µg Protein). Der Versuch wurde mit O-Acetylserin gestartet und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zudem mußten Nullwerte ohne O-Acetylserin bzw. Triazol und Triazol allein gemessen werden, die mit dem Cysteineichwert umgerechnet wurden. Nach Versuchsende gab man 1 ml alkalische Natriumcarbonatlösung (1 M in 0,2 N Natronlauge) zu, erhitzte kurz und zentrifugierte ab. Anschließend wurde die Probe mit dem neutralen Ninhydrin-Reagenz (2.2.3.1) versetzt und erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde bei 460 nm, seinem Absorptionsmaximum, bestimmt.

2.5.12 S-Sulfocysteinlyase

Prinzip

Obwohl diese Enzymaktivität bisher nicht als eigenes Protein beschrieben wurde, zeigte die L-Cystinlyase meist höhere Umsätze mit S-Sulfocystein als mit

L-Cystin. Bei diesem Abbau werden Ammoniak, Sulfit und Pyruvat freigesetzt (24), welches nach 2.2.10.2 bestimmt wurde.



S-Sulfocystein Pyruvat

Durchführung

Der Testansatz enthielt in einen Endvolumen von 1 ml 100 µmol Tris-HCl pH 8,5; 1 µmol S-Sulfocystein (bzw. S-Methyl-L-Cystein) und den Rohextrakt einer Chlorella-Normalkultur (2.1.1.1; 630 µg Protein) bzw. einer Chlorella-Kultur, die auf 3 x 10^{-4} M L-Cystin gewachsen war (750 µg Protein). Es wurde auch ein Rohextrakt von Spinat (1420 µg Protein), Rettich (500 µg Protein), Bohne (930 µg Protein) und Rüpse (24 mg Protein) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei 37°C. Das Pyruvat wurde nach 2.2.10.2 bestimmt. Es mußte stets ein Nullwert ohne Substrat bestimmt werden, der vom Versuchswert abgezogen werden kann.

2.6 Cysteinsynthase-Aufreinigung

2.6.1 Polyminfällung

Der nach 2.1.1.2 hergestellte Rohextrakt wurde, wenn nicht anders vermerkt, mit 10 µl /ml Rohextrakt Polymin gefällt. Den Niederschlag trennte man durch Zentrifugieren bei 10000 g für 15 Minuten ab. Der Überstand wurde zur weiteren Aufreinigung nach 2.6.2 verwendet.

2.6.2 Ammoniumsulfatfällung

Der nach 2.6.1 gewonnene Überstand wurde in zwei Stufen, wenn nicht anders vermerkt, mit Ammoniumsulfat gefällt, die von 0 - 35 % und von 35 - 80 % Sättigung reichten. Den Niederschlag von 35 - 80 % trennte man bei 10000 g für 15 Minuten ab und nahm ihn im Potter in 20 mM Tris-HCl pH 8,0/10 mM Mercaptoäthanol auf.

2.6.3 Gelchromatographie mit Sephadex-G-50; I. Aufreinigung

Die nach 2.6.2 gewonnene Fraktion von 35 - 80 % Ammoniumsulfatsättigung wurde auf einer Sephadex-G-50-Säule (3,8 x 20,5 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 20 mM Tris-HCl pH 8,0, dem 10 mM Mercaptoäthanol zugesetzt worden war, mit 26 ml/Stunde eluiert. Nach Passieren einer Durchflußzelle, die die Extinktion bei 254 nm bestimmte, sammelte man die Fraktionen zu 4,3 ml. Diese wurden

mit den Enzymtesten 2.5.1 - 2.5.4 und 2.5.8 getestet. Die Cysteinsynthase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und weiter aufgereinigt (2.6.4).

2.6.4 Ionenaustauscherchromatographie mit DEAE-Sephacel

Die nach 2.6.3 gewonnene Cysteinsynthase-Fraktion wurde auf einer Ionenaustauschersäule mit DEAE-Sephacel (2 x 10 cm) weitergereinigt. Die Säule eluierte man mit dem gleichen Puffer wie bei 2.6.3 mit einer Geschwindigkeit von 25 ml/Stunde. Nach Passieren einer Durchflußzelle sammelte man Fraktionen von 4,2 ml. Die Proteine wurden nach Anlegen eines Gradienten von 0 - 0,4 M Natriumsulfat (300 ml je Mischkammer) eluiert und in gleicher Weise wie bei 2.6.3 getestet. Die Cysteinsynthase-haltigen Fraktionen wurden vereint, wie dies auch mit den D-Cysteindesulfhydrase enthaltenden Fraktionen geschah. Dieses Enzym wurde erneut auf einer DEAE-Sephacel-Säule nachgereinigt und für die Enzymteste 3.7.3.2 benötigt.

2.6.5 Gelfiltration an Sephadex-G-50; II. Aufreinigung

Die Cysteinsynthase-Fraktion wurde erneut an einer Sephadex-G-50-Säule, wie unter 2.6.3 beschrieben, rechromatographiert. Die Cysteinsynthase-Fraktionen vereinigte man. Das somit gereinigte Enzym wurde unter 3.7.2 - 3.7.4 näher untersucht.

2.6.6 Affinitätschromatographie an Affigel-Blue-A

Diese Cysteinsynthase wurde an einer Affigel-Blue-A-Säule (1,6 x 40 cm) mit einem Gradienten von 0 bis 0,5 M Natriumchlorid (200 ml je Mischkammer) in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 und der Geschwindigkeit von 15 ml/Stunde eluiert. Man sammelte Fraktionen von 5 ml.

2.6.7 Gelchromatographie an Biogel-A 1,5m

Um das Molekulargewicht der Cysteinsynthase zu bestimmen, trennte man die gereinigte Cysteinsynthase an einer Biogel-A 1,5m-Säule (1,6 x 67 cm) auf, wobei ein 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0/0,1 M Kaliumchlorid verwendet wurde. Die Säule, die mit einer Geschwindigkeit von 18 ml/Stunde eluiert wurde, sammelte man in Fraktionen zu 3 ml und testete sie wie unter 2.6.3 beschrieben.

2.6.8 Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Biogel-A

Eine teilgereinigte Enzymfraktion wurde über eine DEAE-Biogel-A-Säule (2 x 6 cm) getrennt. Dies geschah durch Anlegen eines Gradienten von 0 - 0,4 M Natriumchlorid (200 ml je Mischkammer) in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 15 ml/Stunde. Es wurden Fraktionen zu 3,7 ml gesammelt und nach 2.6.3 getestet.

2.7 Geräte

Außer den in den einzelnen Kapiteln genannten Geräten wurden allgemein noch folgende Apparate verwendet :

Einfache spektroskopische Untersuchungen führte man am Festwellenlängen-Photometer PL-4 von Zeiss (Oberkochen) mit den Festwellenlängen 460 nm, 546 nm und 578 nm durch. Andere Wellenlängen sowie Spektren konnten zuerst mit dem Spectrophotometer Model 24 von Beckman (Fullerton, USA) und später besser und schneller mit dem Spectrophotometer DU-7 der gleichen Firma verbunden mit einem Hewlett-Packard Plotter 2672 (Corvallus, USA) gemessen werden. Es wurde stets in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke gemessen.

Routinemäßige Zentrifugationen von Enzymansätzen wurden in der Labofuge GL der Firma Heraeus-Christ (Osterode) mit Swing-out-Rotor durchgeführt. Bei der Aufreinigung von Enzymen oder großen Volumina verwendete man eine WKF-Zentrifuge G 50 K (Brandau), die gekühl wurde.
Bei den Säulenläufen wurde entweder die Colora peristaltic pump 3600 mit variabler Geschwindigkeit oder die LKB 12000 Varioperpex peristaltic pump mit austauschbaren konstanten Getrieben verwendet. Alle Säulenläufe wurden mit 1,1 mm Silikonschläuchen im Pumpenteil betrieben. Um das eluierte Protein aufzuzeichen, wurde der Uvicord II 8300A mit dem Schreiber 6520-4 von LKB verwendet. Die Fraktionen wurden mit dem Ultrorac-Fraktionssammler 7000 von LKB gesammelt. Die Proteinfraktionen wurden über den PM-10-Filter der Diaflow-Zelle (Amincon, Witten) eingeengt.
Die Sauerstoffverbrauchsmessungen geschahen mit einer Sauerstoffelektrode, Typ Clarke, der Firma Bachhover (Reutlingen).

2.8 Chemikalien

2.8.1 Schwefelquellen

Alle Schwefelquellen, die in Tab. 18 angegeben werden, bezog man von den dort angegebenen Firmen. In allen Fällen, ausgenommen das Sulfatmedium,

wurden die Schwefelquellen in einer Konzentration von 3×10^{-4} M dem schwefelfreien Medium (Schwefelmangelmedium) zugesetzt. Höhere Konzentrationen hemmten manchmal das Algenwachstum. Es war dabei nicht nötig, die Natriumionen zu ersetzen. Das Wachstum auf Natriumsulfat wurde stets als Standard herangezogen.

Alle wasserlöslichen Verbindungen wurden durch Sterilfiltration mit einem Bakterienfilter (Porengröße Ø 0,22 µm) zugesetzt. Unlösliche Verbindungen wurden fest entweder vor oder nach dem Autoklavieren zugegeben.
Angesichts der Fülle der Verbindungen konnte nicht überprüft werden, welche Verbindungen durch das Medium oder das Autoklavieren verändert wurden. Für Mercaptoäthanol und DTE trat keine Zersetzung auf.
Alle Substanzen wurden auf Verunreinigungen an Sulfat durch Zugabe von Bariumacetat geprüft. Konnte Bariumsulfat als weißer Niederschlag beobachtet werden, so fällte man das gesamte Sulfat mit weiterem Bariumacetat aus. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlages wurden die überschüssigen Bariumionen beim Durchlauf durch eine Dowex 1 x 50-Säule mit Wasser entfernt. Dieses Eluat wurde ohne erneute Konzentationsbestimmung steril dem Schwefelmangelmedium zugesetzt. Diese Nachreinigung war z.B. für Hydroxyäthansulfonsäure und Mercaptoäthansulfonsäure nötig.

2.8.2 Lösen einiger Verbindungen

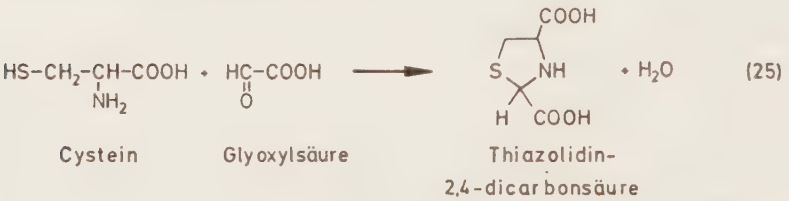
Ein besonderes Problem stellt das Lösen einiger Verbindungen dar. Sollten die Substanzen in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst werden, wie dies für die Trisacryl GF05-Säule notwendig war (2.3.1), so gab man zu folgenden fast unlöslichen Substanzen 100 µl 6N Natronlauge und füllte mit 2/3 des Endvolumens 20 mM Tris-HCl pH 8,0 auf. Die Lösung wurde mit 6 N Salzsäure auf pH 8,0 zurücktitriert. Wegen des geringen Probevolumens überprüfte man dies meist mit dem Indikatorpapier. Einige Verbindungen fielen aber schon aus, so daß sie mit Natronlauge wieder gerade zur Lösung gebracht wurden. Schließlich füllte man auf das Endvolumen auf. Dieses Lösungsverfahren war für folgende Substanzen nötig, wobei der reale pH-Wert in Klammern vermerkt ist, bis zu dem die Verbindung gelöst werden konnte :

L-Cystindimethyl- und -diäthylester, S-Carboxymethyl- und -äthylcystein, S-Carbamoylcystein, Lanthionin, Djenkolsäure, Äthionin (pH 9,0), S-Methyl- und S-Äthylcystein (beide pH 10,0), Cystin und Homocystin (beide pH 12,0).

2.8.3 Chemische Synthesen

2.8.3.1 Synthese von Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure

Zu Vergleichszwecken mit der in Chlorella, Spinat und Lemna vermuteten 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure synthetisierte man die Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure nach folgender Gleichung (25) :



Dabei reagiert Glyoxylsäure mit Cystein unter Wasserabspaltung zu Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure (BALL 1966). Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Endvolumen von 9 ml 450 µmol Phosphatpuffer pH 6,8; 900 µmol L-Cystein und 900 µmol Glyoxylsäure. Nach der Inkubation für 30 Minuten bei 60°C wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer bei 60°C auf 1 ml eingeengt. Dabei fiel Cystin aus, das man durch Zugabe von 2,5 ml 0,1 M DTE sowie 1 ml 1 M Glyoxylsäure und 200 µl 1 M Phosphatpuffer pH 6,8 wieder in Lösung brachte. Der Reaktionsansatz wurde anschließend an einer Trisacryl GF05-Säule (2.3.1) aufgereinigt. Dabei trennte man das unreagierte L-Cystein (Fraktion 39, Tab. 3) und die Glyoxylsäure (Fr. 79) sowie das DTE (Fr. 40) von der Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure ab, welche in Fraktion 22 bei 2,5 ml Fraktionsvolumen zu finden war. Sie konnte mit dem sauren Ninhydrinreagenz (2.2.3.2) nachgewiesen werden.

2.8.3.2 Synthese des Cystein-DTE-Adduktes

Für den Vergleich mit den in vivo und in vitro gebildeten Gaitonde-positiven Verbindungen, wurde das Cystein-DTE-Addukt nach (26) hergestellt :

Der Reaktionsansatz enthielt in 20 ml Endvolumen 50 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM DTE und 2 mM Cystein. Nach der Inkubation bei 37°C für eine Stunde, wurde das Addukt am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und in 1 ml Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen.

2.8.3.3 Synthese von S-Methylcysteinsulfoxid

Da diese Synthese von Dr. habil H.-P. Köst durchgeführt wurde, soll nur kurz das Verfahren beschrieben werden, da diese Verbindung bei Untersuchungen zum Cysteinmetabolismus verwendet wird. Man ließ 2 g S-Methyl-L-Cystein mit 30 % Wasserstoffperoxid einen Tag lang bei 70°C reagieren und engte sie dann zur Trockene ein. Die weiße Substanz wurde dann an einer Dowex 50 WX 8-Säule (20 - 50 mesh; Gegenion H^+, 2.3.4) mit 15 % Ammoniaklösung eluiert und zur Trockene eingeengt. Sie enthielt kein Sulfat, da bei Zugabe von Bariumacetat kein Niederschlag auftrat.

2.8.3.4 Synthese von Glutathionsulfonsäure

Die Synthese führte Dr. habil H.-P. Köst durch. 5 g reduziertes Glutathion wurden mit einem Überschuß Perameisensäure, die nach HIRS (1956) aus Wasserstoffperoxid und Ameisensäure hergestellt worden war, versetzt und 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend lyophilisierte man den Reaktionsansatz, löste ihn erneut und fällte das Sulfat mit Bariumacetat aus. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages entfernte man die überschüssigen Bariumionen an einer Dowex 50 WX 8-Säule.

2.8.3.5 Synthese von Alkylsulfonsäuren

Auch diese Synthesen wurden von Dr. habil H.-P. Köst durchgeführt. Kaliumpermanganat war das Oxidationsmittel für die Bildung von 1,2-Äthandisulfonsäure aus 1,2-Äthandithiol, von Sulfopropionsäure aus Mercaptopropionsäure und von 2,2-Thiodiessigsäuresulfon aus Thiodiessigsäure. Zur Entfernung von K^+ setzte man eine Dowex 50 WX 8-Säule mit dem Gegenion H^+ ein. Alle Präparate wurden mit Bariumacetat sulfatfrei gemacht.
Wasserstoffperoxid war das Oxidationsmittel für die Synthese von 2,2-Thiodiessigsäuresulfoxid aus Thiodiessigsäure und von S-Methylpropionsäuresulfoxid aus Sulfopropionsäuremethylester.

2.8.4 Sonstige Chemikalien

Außer den in Tab. 18 beschriebenen schwefelhaltigen Verbindungen, deren Bezugsquellen auch dort vermerkt sind, erhielt man alle Chemikalien, außer den im Folgenden genannten von der Firma Merck (Darmstadt). Von der Firma Serva (Heidelberg) waren Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, L-Cycloserin, Dithiothreit (DTT), p-Aminodimethylanilin, Dowex 50 WX 8 und die Eichproteine, Katalase, Aldolase, Rinderseralbumin, Hühnerseralbumin, Chymotrypsinogen und Cytochrom C.

Von Sigma (St. Luis, USA) stammen L- und D-Alanin, 1,2,4-Triazol, O-Acetyl-L- bzw. O-Acetyl-D-Serin, Phospho-L-Serin, N-Acetyl-L-Serin, ß-Cyano-L-Alanin, α-Keto-γ-Methiolbutyrat , D-Homoserin, D/L-Homoserin und L-Cysteinäthylester. ATP, Pyridoxalphosphat, L- und D-Aminosäureoxidase erhielt man von Boehringer (Mannheim). Saccharose, Äthylacetat, Glyoxylsäure, Dithioerythrit (DTE), Essigsäure, Methanol und Aceton wurden von Roth (Karlsruhe) hergestellt. Natriumthiosulfat, Hydrindantin und ß-Mercaptopyruvat waren von Fluka AG. (Buchs, Schweiz), L-Cysteinmethylester von EGA-Chemie (Steinheim), Isopropanol von Riedel de Haen (Seelze - Hannover),S-Sulfo-L-Cystein von Pierce Eurochemie (Rotterdam, Holland), Polymin P von BASF (Ludwigshafen), DyeMatrex von Amicon (Lexington, USA), Affigel-Blue-A, Biorad protein assay und Biogel 1,5 m von Biorad (Richmond, USA), L-Cystindimethyl- und L-Cystindiäthylester sowie L-Cysteinamid von ICN (Plainview, USA), DEAE-Sephacel, Sephadex-G-50 und DEAE-Biogel-A von Pharmacia (Uppsala, Schweden), Trisacryl GF05 von LKB (Bromma, Schweden), Hydroxy-L- und L-Prolin von Calbiochem (Giessen), (^{35}S)-Natriumsulfat von Amersham-Buchler (Braunschweig) und (^{35}S)-Cystein von NEN (Dreieichenhein.

3.0 E R G E B N I S S E und D I S K U S S I O N

Im folgenden Teil sollen die vielfältigen Ergebnisse zu einzelnen Themenkomplexen zusammengefaßt dargestellt und diskutiert werden, um eine gewisse Übersichtlichkeit zu wahren. Dabei wird zuerst auf die Eigenschaften und das Ausarbeiten analytischer Methoden (3.1, 3.2, 3.3) eingegangen, um dann physiologische Untersuchungen zur Regulation von Enzymen (3.4), die Bildung einzelner Verbindungen (3.5 und 3.6) sowie die Charakterisierung der Cysteinsynthase (3.7) darzustellen.
In die Gesamtdiskussion (4.0) werden nur solche Aspekte jedes Versuchskomplexes einbezogen, die zu übergreifenden Überlegungen und letztlich einigen Thesen notwendig sind. Eine detaillierte Aufarbeitung der speziellen Probleme erfolgt direkt im Anschluß an die Darstellung der Ergebnisse eines einzelnen Versuchskomplexes anhand der speziellen Literatur . Dabei wird, um den Rahmen dieser Arbeit nicht zu sprengen, bevorzugt Literatur über phototrophe Organismen,wie phototrophe Bakterien, Blaualgen, Algen und höhere Pflanzen herangezogen und dort auf andere Organismen wie Bakterien und Tiere zurückgegriffen, wo für die Reaktionsschemen keine ausreichenden Befunde für phototrophe Organismen vorliegen.

3.1 Spezifität und Eigenschaften der verwendeten chemischen Nachweisverfahren

In diesem Themenkreis sollen die Eigenschaften einiger chemischer Nachweisverfahren ausführlicher abgehandelt werden, da diese in verschiedenen Versuchsteilen zur Anwendung kommen und die Kenntnis ihrer Spezifität für die Diskussion der Versuchsergebnisse von großer Wichtigkeit ist.

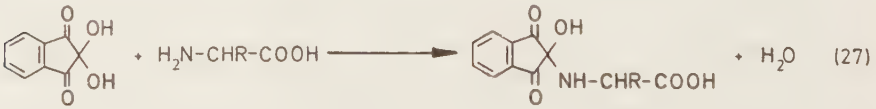
3.1.1 Allgemeines Verfahren zur Aminosäurebestimmung

Zum Nachweis von Aminosäuren sind mehrere Verfahren bekannt, von denen die einfache Methode 2.2.3.1 mit Ninhydrin unter fast neutralen Bedingungen ausgewählt wurde. Da eine strenge Linearität und Reproduzierbarkeit beim Austesten der Trisacryl GF05-Säule nicht so wichtig war, konnte auf komplizierte Ninhydrinlösungen, wie diese von der automatischen Aminosäureanalyse her bekannt sind, die oft Dimethylsulfoxid, Methylcellosolve, Zinnchlorid oder Hydrindantin enthalten, verzichtet werden.
Fast alle biogenen Aminosäuren, wie auch Thiocyanat (NEUZIL et al. 1971),bilden mit Ninhydrin unter den genannten Bedingungen das sogenannte "Ruhemann's Purpur", welches nach Erhitzen auf 100°C als blaue Reaktionslösung beobachtet werden

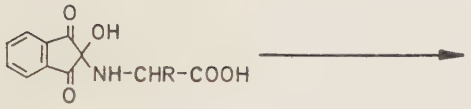
kann. Diese Verbindung hat etwa gleich große Absorptionsmaxima bei 404 nm und 570 nm, wie dies auch aus Abb. 3a für Alanin gezeigt werden kann. Meistens werden die Aminosäuren jedoch bei 570 nm bestimmt, da die Nullwerte für 404 nm erheblich höher liegen. Die Struktur (VII) wurde als Diketohydrindyliden-diketohydrinamin (DYDA) von RUHEMANN (1911) beschrieben, wobei es sich um das Anion handelt (HARDING und McLEAN 1916), welches die typische blaue Färbung besitzt. Es kann gut in Wasser, dagegen schlecht in organischen Lösungsmitteln, gelöst werden. Der Komplex hat ein Reaktionsmaximum von pH 5 - 6, was von der jeweiligen Aminosäure abhängt. Er ist nur bis pH 4 stabil (MOORE und STEIN 1948). Unter stärker sauren Bedingungen wird kein Ruhemann's Purpur (VII) mehr gebildet, was an der Entfärbung der blauen Reaktionslösung sichtbar wird (DOI et al. 1981).

Bevor hier auf die Besonderheiten der Nachweise von einigen schwefelhaltigen Aminosäuren eingegangen wird, soll der Reaktionsweg vom Ninhydrin zum DYDA dargestellt werden, wobei die Theorien von McCALDIN (1960) und LAMOTHE und McCORMICK (1973) zusammengefaßt werden. Es sei auch auf die in diesen Arbeiten geäußerten Einwände hingewiesen, da bis heute kein allgemein gültiger Reaktionsweg existiert.

2,2-Dihydroxy-1,3-indandion (II; Ninhydrin) reagiert mit Aminosäuren unter neutralen Bedingungen nach dem bekannten Strecker-Abbau (27), wobei das Zwitterion (III) nach Decarboxylierung (28) auftritt, welches unter Hydrolyse (29) in das 2-Amino-indandion (IV) übergeht. Dieses kann nach weiterer Hydrolyse Ammoniak freisetzen und dabei 2-Hydroxy-indandion (V) bilden (30). Zugleich kann nach dem von LAMOTHE und McCORMICK (1973) vorgeschlagenen Mechanismus 2-Amino-indandion (IV) mit einem weiteren Molekül Ninhydrin (II) zu 2-Imino-indandion (VI) und 2-Hydroxy-indandion (V) reagieren (31). In dem letzten Schritt vereinigen sich 2-Hydroxy-indandion (V) und 2-Imino-indandion (VI) zu dem bekannten Ruhemann's Purpur (VII; DYDA; (32)), dessen Ammonium- oder Natriumion den blauen Farbkomplex (λ_{max} 570 nm und 456 nm) ergibt (HARDING und McLEAN 1916; MOORE und STEIN 1948). Die Beteiligung von Hydrindantin (VIII) ist sehr umstritten. Bei dem geschilderten Reaktionsverlauf kann das 2-Hydroxy-indandion (V) als Reaktionsprodukt aus dem reduzierten Ninhydrin (II), dem Hydrindantin (VIII), nach (33) hervorgehen (LAMOTHE und McCORMICK 1973).

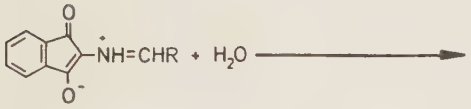


(II)
Ninhydrin



(28)

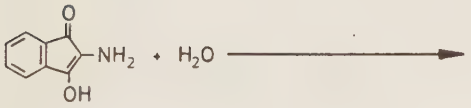
(III)



(29)

(III) (IV)

2-Amino-indandion



(30)

(IV) (V)

2-Amino-indandion 2-Hydroxy-indandion

(31)

(IV) (II) (VI) (V)

2-Amino-indandion Ninhydrin 2-Imino-indandion 2-Hydroxy-indandion

(32)

(VI) (V) (VII)

2-Imino-indandion 2-Hydroxy-indandion Diketohydrindyliden-diketohyrindamin

(33)

(VIII) (V) (II)

Hydrindantin 2-Hydroxy-indandion Ninhydrin

Bei den Nachweisen von schwefelhaltigen Aminosäuren mit Ninhydrin können nicht nur das übliche Ruhemann's Purpur, sondern auch gelbe Farbreaktionen beobachtet werden, auf die im Folgenden eingegangen werden soll. Das Reaktionsprodukt von L-Cystein, D-Cystein, Cystin, S-Carbamoylcystein, S-Sulfocystein und Cystein- bzw. Cystinestern ist gelb gefärbt und zeigt das Spektrum Abb. 3a und 3b mit einem Absorptionsmaximum bei 456 nm. Das Spektrum ist deutlich von dem normalen Ruhemann's Purpur unterschieden und weist eine geringere Extinktion bei gleicher Konzentration als das von Leucin bei 570 nm auf (18% von Leucin, FRIEDMAN und SIGEL 1966). Dieser Spektrumstyp tritt nur bei S-haltigen Aminosäuren auf (MOORE und STEIN 1948; WHITAKER 1961) und ist deutlich von dem gelben Komplex (λ_{max} = 440 nm) mit Prolin bzw. Hydroxyprolin unterschieden (MOORE und STEIN 1948; TROLL und CANNAN 1953). Auch Cystein- und Cystinester zeigen eine gelbe Farbe, wenngleich das Spektrum nur ein kleines relatives Maximum bei 456 nm aufweist (Abb. 3b). Da bekannt war, daß Ruhemann's Purpur nur bei pH-Werten über 3,5 stabil ist (DOI et al. 1981), wurde vermutet, daß es sich bei den verschiedenen Spektren nur um pH-Effekte handeln könnte. Durch Nachmessen wird dies aber ausgeschlossen, da die Reaktionslösung stets nicht saurer als pH 6,0 war.

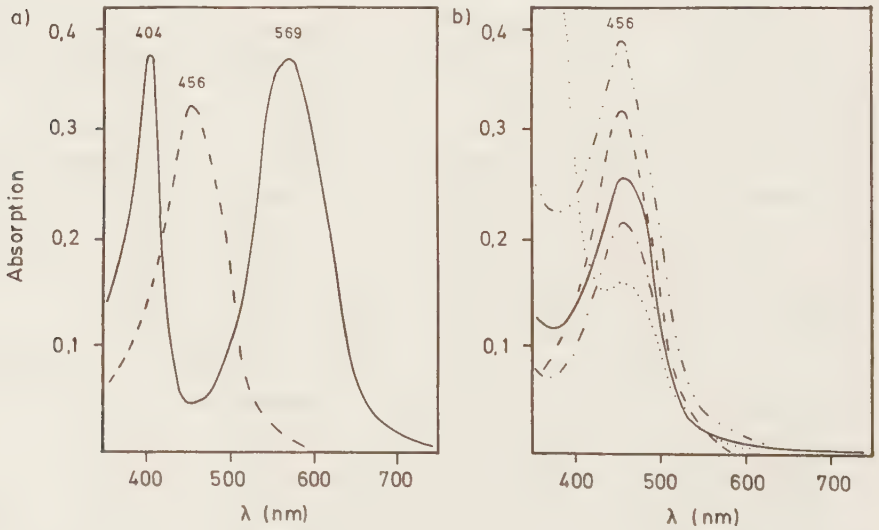


Abb. 3 : Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte von Ninhydrin mit schwefelhaltigen Aminosäuren

a) ——— Alanin 1 mM ; - - - S-Sulfocystein 0,1 mM

b) ——— L-Cystein 0,2 mM; - - - S-Sulfocystein 0,1 mM; -.-.- S-Carbamoylcystein 0,2 mM
-..-. L-Cystin 0,2 mM; ..... L-Cysteinmethylester 5 mM.

Die Aminosäuren wurden in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst und nach 2.2.3.1 mit Ninhydrin nachgewiesen. Das Spektrum wurde gegen eine aminosaurefreie Probe gemessen.

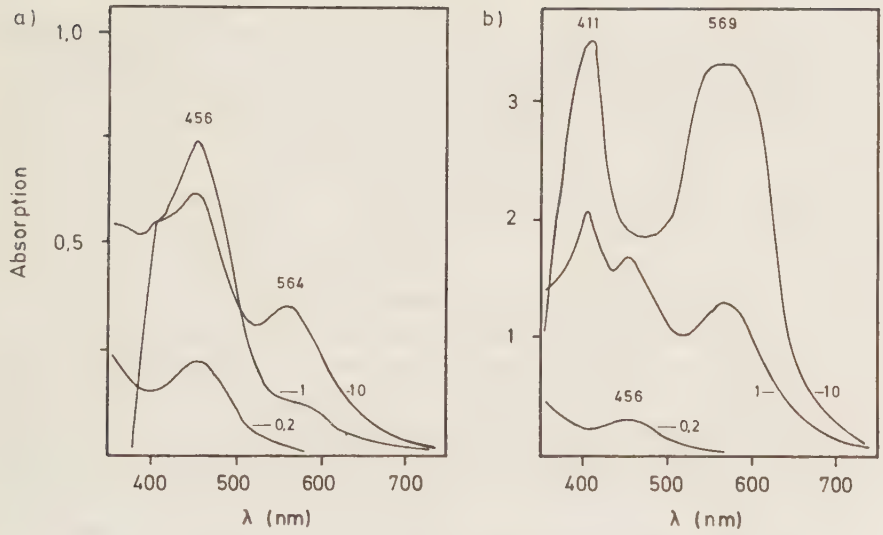


Abb. 4 : Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte von Ninhydrin mit Cystein und Cystin

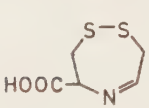
a) L-Cystein 0,2 mM; 1 mM und 10 mM ; b) L-Cystin 0,2 mM, 1 mM und 10 mM
Beide Verbindungen wurden, wie in Abb. 2 beschrieben, gelöst, nachgewiesen und gegen einen Ninhydrin-Nullwert gemessen.

Bei genaueren Untersuchungen zeigte sich bald, daß die Reaktionen von Ninhydrin mit Cystein und -derivaten erheblich komplizierter sind. Für die weiteren Betrachtungen ist besonders zu erwähnen, daß die Reaktion stark von der Konzentration des Cysteins und der Reaktionszeit abhängt, wie dies in Abb. 4a und 4b für Cystein und Cystin dargestellt ist. Geringe Mengen von Cystein und Cystin zeigen das typische Spektrum (λ_{max} = 456 nm), während größere Mengen auch zur Bildung von Ruhemann's Purpur (λ_{max}= 569 nm) zu führen scheinen, wie dies besonders für Cystin (10 mM) schon anhand der rotbraunen Farbe, die sich aus dem gelben und violetten Komplex zusammensetzt, beobachtet werden kann. Ähnliche Effekte können auch bei Cystathionin auftreten.

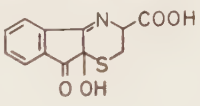
Das allgemein ungewöhnliche Verhalten der schwefelhaltigen Diaminosäuren, wie Cystin, Cystathionin, Cystamin und Djenkolsäure kann auf die Bildung eines Aminoaldehyds nach der Decarboxylierung und Deaminierung einer Aminogruppe zurückgeführt werden, das mit der zweiten Aminogruppe zu einem Ring zyklisiert wie dies FRIEDMAN et al. (1979) für Cystin beschrieben haben (IX).

Dabei bildet sich ein stabiler Siebenring einer Schiff'schen Base (IX), so daß der Einfluß der Thiolgruppe bei der Reaktion mit Ninhydrin ausgeschlossen wird und ein Ruhemann Purpur gebildet werden kann. Dabei scheinen die

Konzentrationsverhältnisse entscheidend zu sein, so daß in unseren Versuchen einmal wegen der freien Thiolgruppe keine Blaufärbung, das andere Mal die Thiolgruppe blockiert und somit eine Blaufärbung auftrat.

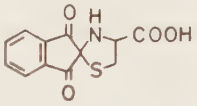


(IX)



(X)

Thiazin-derivat



(XI)

Versucht man nun durch Vergleich der Absorptionsmaxima des gelben Cystein-Ninhydrin-Komplexes und den in der Literatur dafür beschriebenen Reaktionsprodukten die Struktur des beobachteten Komplexes zu ermitteln, so kann keine Übereinstimmung festgestellt werden. Es handelt sich dabei entweder um ein Triazinderivat (X) (KUHN und HAMMER 1951; FRIEDMAN und SIGEL 1966) oder um eine Spiroverbindung (XI) (PROTA und PONSIGLIONE 1973), die aber nur im UV-Bereich Absorptionsmaxima aufweisen. Bei den dort beschriebenen Reaktionen von Ninhydrin mit Cystein unter neutralen Bedingungen scheint die stark nucleophile Sulfhydrylgruppe 300 mal schneller als die Aminogruppe des Cysteins einen nucleophilen Austausch mit einer Hydroxylgruppe des Ninhydrins durchzuführen, um (X) oder (XI) zu bilden (FRIEDMAN et al. 1965). Würde die Aminogruppe zuerst reagieren können, müßte DYDA auftreten, was nach den Spektren aber nicht der Fall ist (FRIEDMAN und SIGEL 1966). Nach neueren Arbeiten scheint dabei die Spiroverbindung (XI) das bevorzugte Isomer zu sein (PROTA und PONSIGLIONE 1973). Die Struktur des gelben Komplexes bleibt somit immer noch im Dunkeln.

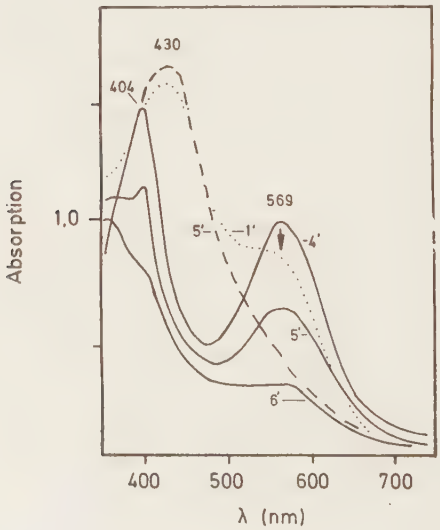


Abb. 5 :

Absorptionsspektrum des Reaktionsproduktes von Ninhydrin mit ß-Cyanoalanin

——— 1 mM bei 4, 5 und 6 Minuten

- - - 10 mM bei 5 Minuten

..... 10 mM bei 1 Minute Inkubation

ß-Cyanoalanin wurde, wie in Abb. 2 beschrieben gelöst, mit Ninhydrin nach 2.2.3.1 behandelt und das Spektrum nach der angegebenen Zeit gegen einen Ninhydrin-Nullwert aufgenommen.

Von den anderen Aminosäuren, die nicht den üblichen Farbkomplex DYDA ergeben, soll nur noch auf das für diese Arbeit bedeutsame ß-Cyanoalanin eingegangen werden. Während anfangs kein Absorptionsmaximum beobachtet werden konnte, zeigt Abb. 5, daß die Reaktion stark zeit- und konzentrationsabhängig ist, da nur bei kurzen Zeiten, 4 Minuten bei 1 mM bzw. 1 Minute bei 10 mM, der typische Ruhemann Komplex DYDA mit dem Absorptionsmaximum bei 569 nm auftritt. Da die Inkubation im Routineverfahren 2.2.3.1 nach 5 Minuten beendet wurde, konnte schon meist kein DYDA beobachtet werden.
Von den anderen Aminosäuren, die besondere Farbkomplexe ergaben,soll nur erwähnt werden, daß Cystamin ein Absorptionsmaximum bei 362 nm aufweist, während 3-Amino-1-propan-sulfonsäure überhaupt nicht in Flüssigkeiten nachweisbar ist. Dies gelingt nur nach Auftragen auf Kieselgel oder Papier und anschließendem Ansprühen mit einer 0,5 % äthanolischen Ninhydrinlösung. Diese Ergebnisse können somit nur semiquantitativ sein. Auch Taurin und Djenkolsäure sind im Nachweis problematisch, da sie bisweilen keinen Farbkomplex, manchmal aber auch das übliche DYDA bilden, so daß erst genauere Reaktionsbedingungen ausgearbeitet werden müßten.

3.1.2 Thiolbestimmung

Wie unter 2.2.4 beschrieben, können Thiole durch die Reaktion mit 5-Dithio-2-nitrobenzoesäure (DTNB) als 5-Thio-2-nitrobenzoesäureanion (TNB) mit dem in Abb. 6 dargestellten Spektrum nach Gleichung (2) bestimmt werden (ELLMAN 1959).

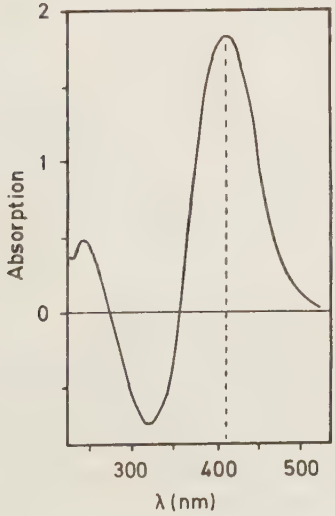


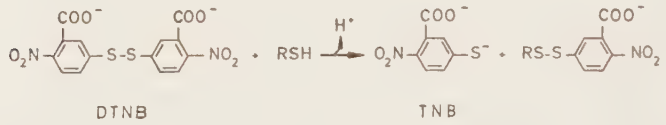
Abb. 6 :

Absorptionsspektrum des 5-Thio-2-nitrobenzoesäureanions (TNB)

Der Reaktionsansatz 2.2.4 enthielt 100 µmol Tris-HCl pH 7,5 ; 200 nmol Cystein in einem Endvolumen von 1 ml.
Das Spektrum wurde 10 Minuten nach Zugabe von 0,1 µmol äthanolischem DTNB gegen einen Nullwert ohne Cystein aufgenommen.

Die Reaktion benötigt für Thiole unterschiedliche Inkubationszeiten, wie dies für Cystein und reduziertes Glutathion (2 min.) beobachtet wird (WENCK et al. 1972). Das TNB-Anion ist zudem nur kurz stabil. Das Absorptionsmaximum liegt bei 412 nm, wenngleich in unserem Labor die Messungen oft aus technischen Gründen bei 460 nm durchgeführt wurden. Unter unseren Bedingungen (Tris-Puffer pH 7,5) beträgt das $\varepsilon_{412\ nm}$ 9,46 x 10^6 cm^2 x mol^{-1} für Cystein, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Differenz zu dem aus der Literatur bekannten Wert von 13,6 x 10^6 cm^2 x mol^{-1} (ELLMAN 1959) nicht nur auf andere Pufferverhältnisse (dort Phosphatpuffer), sondern auch auf einen gewissen Anteil (30%) von Cystin in der Cysteinlösung zurückzuführen sein könnte.

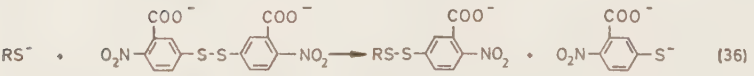
Das Verfahren ist für Thiole, Mercaptide und Mercaptane geeignet. Nach BALL (1966) können Cystein, Cysteamin, Glutathion, Homocystein und Dimercaptopropanol (BAL) nachgewiesen werden, wobei 1 mol BAL nahezu 2 mol TNB freisetzt. Für Monothiole kann ein 1/1-Verhältnis beobachtet werden. Die folgenden Teilgleichungen (34 - 36) zeigen die Einzelschritte dieser Reaktion.



DTNB TNB (2)

TNB (34)

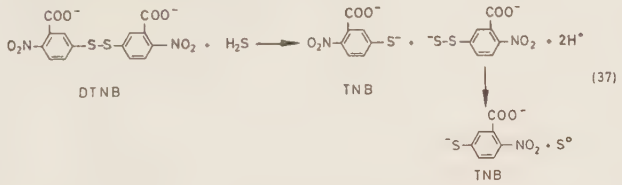
TNB (35)



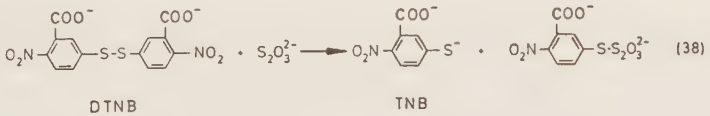
DTNB TNB (36)

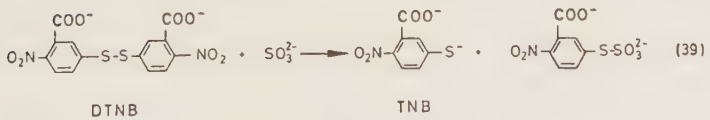
Wenn DTNB im Unterschuß vorliegt, laufen nur die Reaktionen (2) bzw. (34 -36) ab (MAN und BRYAN 1974), so daß ein Verhältnis von Thiol zu TNB von 2/1 auftritt.

Bei der Reaktion von Schwefelwasserstoff mit DTNB werden 2 Mole TNB pro Mol Schwefelwasserstoff freigesetzt, wobei das zwischenzeitlich gebildete Persulfidanion zu elementarem Schwefel und TNB zerfällt (37) (NASHEF et al. 1977). Das $\varepsilon_{412\ nm}$ beträgt 1,95 x 10^6 cm^2 x mol^{-1}.



Die in den Gleichungen (2) und (34 - 37) beschriebenen Reaktionen laufen nur in einem begrenzten pH-Bereich (7 - 9) linear ab, weil zu niedrige pH-Werte (GRASSETTI und MURRAY 1967; JOCELYN 1962) wie auch zu hohe pH-Werte (DANEHY et al. 1971) das gebildete TNB-Anion zerstören.
Auch Cyanid, Schwefeldioxid (BENEDICT und STEDMAN 1970), Thiocyanat (KAKAC und VEJDELEK 1974, 77, 83), Thiosulfat ((38); MAN und BRYAN 1974), Sulfit ((39); MAN und BRYAN 1974; WEITZMAN 1975) und Thiolactone (GLASER et al. 1970) können mit diesem Verfahren nachgewiesen werden.





Eine Hemmung wird zudem durch 3% Aceton (50%) und 10 mM Pyruvat (20%) beobachtet (eigene Ergebnisse). Der Test läßt nur eindeutige Aussagen zu, wenn die Ergebnisse durch andere Methoden, wie eine Trisacryl GF05-Säule, abgesichert werden können.

3.1.3 Schwefelwasserstoffbestimmung

Sulfid kann aus wässrigen Lösungen nach der unter 2.2.5 beschriebenen Methode mit N,N'-Dimethyl-p-phenylendiamin als Methylenblau nachgewiesen werden, dessen Absorptionsmaxima bei 293 nm, 616 nm, 669 nm und 746 nm (Intensitätsverhältnisse 68,5 %/ 67,5 %/ 100 %/ 50,7 %) liegen (Abb. 7; FOGO und POPOWSKI 1949).

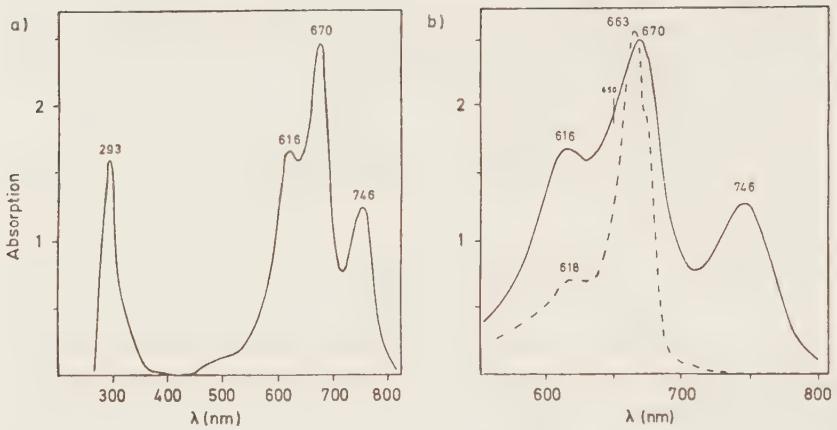


Abb. 7 : Absorptionsspektrum von Methylenblau

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 100 µmol Tris-HCl pH 9,0; 2 µmol DTE und 200 nmol Schwefelwasserstoffdf. Die Probe wurde nach 2.2.5 behandelt und gegen einen Nullwert ohne Schwefelwasserstoff gemessen. - - - = Spektrum von Chlorophyll

Obwohl die meisten Messungen bei 670 nm durchgeführt wurden, wäre es in einigen Fällen wegen des ähnlichen Spektrums von Chlorophyll (Abb. 7b) von Vorteil gewesen, das gebildete Methylenblau bei 746 nm zu bestimmen, obwohl die Empfindlichkeit nur 50% von der bei 670 nm beträgt, um jede Störung durch Chlorophyll auszuschließen. Diese Eigenschaften wurden erst gegen Ende der Arbeit bekannt, so daß man besonders bei gebundenem Sulfid 2.5.6 bei 650 nm maß. Methylenblau ist allerdings nur für circa einen Tag im Dunkeln stabil.

Der Test ist für Schwefelwasserstoff nicht ganz spezifisch, da auch Monothiole, wie Mercaptoäthanol (1 mM, $E_{670\ nm}$= 1,9) oder Glutathion (reduziert, 1 mM, $E_{670\ nm}$= 0,075),Methylenblau bilden können (KOH und IWASAKI 1967; SIEGEL 1965 und eigene Ergebnisse). Die positive Reaktion des Mercaptopyruvates ist auf seine Hydrolyse durch das zweite Nachweisreagenz des Schwefelwasserstoff-Reagenzes (2.2.5), welches Eisen-(III)-chlorid in 1,2N Salzsäure enthält, zurückzuführen, da der freigesetzte Schwefelwasserstoff in einer Zinkacetatfalle (0,1 M in 0,1 M Tris-HCl pH 7,0) als solcher nachgewiesen werden konnte. Mercaptopyruvat bildet somit keinen eigenen Komplex mit dem Dimethyl-p-phenylendiamin. Die Strukturanaloge, Thioglycerin und Thioglycolsäure zeigen dieses Verhalten nicht (eigene Ergebnisse).Cystein allein zeigt keine negative Interferenz. Auch Thiocyanat (0,1 mM, $E_{670\ nm}$ = 0,012) bildet in kleinen Konzentrationen Methylenblau, wohingegen höhere Konzentrationen (ab 1 mM) den typischen

Eisenrhodamin-Komplex (3.1.4) zu bilden scheinen, weil ein neues Absorptionsmaximum bei 460 nm auftritt.

Tab. 1 : Hemmung der Methylenblaubildung

Zugesetzte Verbindung	Konzentration	Hemmung	Referenz
Tris-Puffer	100 mM	0 %	SIEGEL (1965)
Phosphat-Puffer	100 mM	8 %	SIEGEL (1965)
Acetat-Puffer	100 mM	5 %	SIEGEL (1965)
EDTA	4 mM	0 %	SIEGEL (1965)
Pyrophosphat	40 mM	86 %	SIEGEL (1965)
Pyridoxalphosphat	1 mM	12 %	SIEGEL (1965)
Sulfit	10 mM	92 %	SIEGEL (1965)
	5 mM	91 %	eigene Ergebnisse
Thiosulfat	10 mM	93 %	SIEGEL (1965)
	1 mM	97 %	SIEGEL (1965)
	0,5 mM	61 %	eigene Ergebnisse
Cyanid	10 mM	50 %	eigene Ergebnisse (Tab. 2)
Thiocyanat	1 mM	13 %	eigene Ergebnisse
Dithionit	n.b.	n.b.	PACHMAYR (1960)
Mercaptoäthanol (ME)	10 mM	8 %	SIEGEL (1965)
	2 mM	60 %	eigene Ergebnisse
Mercaptopyruvat	1 mM	16 %	eigene Ergebnisse
Cystein	10 mM	70 %	SIEGEL (1965); KREDICH et al. (1973)
	2 mM	74 %	eigene Ergebnisse
	1 mM	13 %	SIEGEL (1965)
	0,8 mM	14 %	KREDICH et al. (1973)
Homocystein	30 mM	n.b.	SCHWENN et al. (1983)
Glutathion (GSH)	10 mM	38 %	SIEGEL (1965)
	2 mM	66 %	eigene Ergebnisse
Dithioerythritol (DTE)	10 mM	36 %	eigene Ergebnisse
	2 mM	0 %	eigene Ergebnisse
Dimercaptopropanol (BAL)	2 mM	5 %	eigene Ergebnisse
Cysteinsulfinsäure	10 mM	19 %	SIEGEL (1965)
S-Sulfocystein	10 mM	5 %	SIEGEL (1965)

Zu einer Eichlösung von Natriumsulfid werden die genannten Verbindungen gegeben und die Hemmung der Methylenblaubildung gegen eine Probe ohne weiteren Zusatz bestimmt. n.b. = nicht bestimmt.

Es sind eine Vielzahl von Verbindungen bekannt, die den Nachweis stören können (Tab. 1). Dies trifft besonders für Thiosulfat, Cyanid, Mercaptoäthanol und Cystein zu, die für die weiteren Arbeiten von Bedeutung sind, so daß stets ein Eichwert mit Sulfid gemessen werden mußte. Dabei ist zu bedenken, daß Sulfidlösungen relativ schnell oxidieren und zudem pH-empfindlich sind. Der Test kann deshalb nur im Alkalischen durchgeführt werden, da sonst Schwefelwasserstoffgas entweicht. Thiosulfat reagiert mit dem gebildeten Methylenblau zu Leukomethylen-

blau, wobei die Farbe abnimmt (PACHMAYR 1960). Dithiole zeigen fast keinen Einfluß, wohingegen Monothiole den Nachweis erheblich stören.
Die Extinktionswerte der Enzymteste, die Methylenblau verwenden, sind in Tab. 2 dargestellt. Auch hier stören Thiosulfat , Cyanid und Methanol zum Teil erheblich.

Tab. 2 : Übersicht über Methylenblau-bildende Teste und deren molare Extinktionskoeffizienten

Testkomponenten	Nachweisverfahren						
	Nullwert	DC	HPLC	CDS	TSR	CAS	MNS
1 M Tris pH 9,0	100 µl	------	------	------	100 µl	100 µl	------
1 M Tris f. B.	------	100 µl	100 µl	100 µl	------	------	100 µl
20 mM DTE	------	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	------	20 µl
2 mM Thiosulfat	------	------	------	------	100 µl	------	------
8 mM L-Cystein	------	------	------	100 µl	------	------	------
0,1mM Cyanid	------	------	------	------	------	10 µl	------
Methanol	------	400 µl	------	------	------	------	------
Methanol/Wasser (85/15)	------	------	500 µl	------	------	------	------
$\varepsilon_{670\ nm}$ $cm^2 \times mol^{-1}$	33,6	19,3	21,9	28,5	12,0	16,9	------
% des Nullwertes	100 %	57 %	65 %	85 %	36 %	50 %	------
$\varepsilon_{650\ nm}$ $cm^2 \times mol^{-1}$	26,3	------	------	------	------	------	9,7
% des Nullweres	100 %	------	------	------	------	------	50 %
Eichbereich (nmol)	n.b.	n.b.	n.b.	- 100	- 500	- 100	n.b.

Um die Ergebnisse der H_2S-bildenden Teste quantifizieren zu können, wurden Schwefelwasserstoff-Eichkurven unter oben genannten Bedingungen mit steigenden H_2S-Mengen (1 - 1000 nmol/ml) und den genannten Zusätzen in einem Endvolumen von 1 ml gemessen (2.2.5).
Folgende Abkürzungen wurden verwendet :
DC = Dünnschichtchromatographie 2.4.1.2; HPLC = Hochdruckflüssigkeitschromatographie 2.3.5 und 3.5.1;
CDS = L-Cysteindesulfhydrase 2.5.3.1; TSR = Thiosulfatreduktase 2.5.4; CAS = ß-Cyanoalanin 2.5.9;
MNS = Methanolniederschlag = gebundenes Sulfid 2.5.6.; n.b. = nicht bekannt

Es sei schon hier erwähnt, daß Sulfid auch aus DTE, Cystein oder Cysteinäthylester (BIEDLINGMEIER et al. 1984) in Gegenwart von Eisen-(III)-ionen oder Chlorellamedium Schwefelwasserstoff freisetzt, was leicht als in vivo gebildeter Schwefelwasserstoff interpretiert werden könnte (3.6.3 ; SAKURAI et al. 1982).

3.1.4 Eisenrhodamin-Komplex

Bei der Bestimmung von Thiosulfat 2.2.7 , Thiocyanat 2.2.6 wie auch der Rhodaneseaktivität 2.5.5 tritt stets ein Eisenrhodamin-Komplex auf, dessen Eigenschaften hier dargestellt werden sollen.

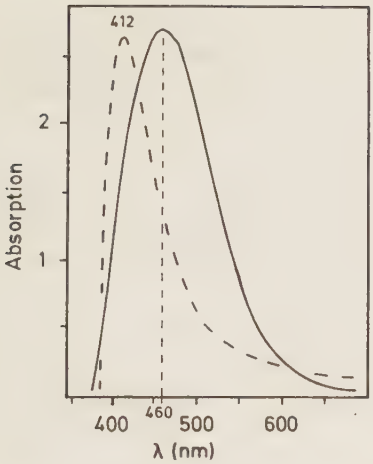


Abb. 8 : Absorptionsspektrum des Eisenrhodamin-Komplexes

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 100 µmol Tris-HCl pH 9,0; 1 µmol Natriumthiocyanat (———) bzw. Mercaptopyruvat (- - -) und 18 µmol Eisen(III)-chlorid, gelöst in 65 % Salpetersäure. Der rote Eisenrhodamin-Komplex wurde gegen einen Thiocyanat-freien Nullwert bestimmt (2.2.6).

Kaliumthiocyanat wird mit dem Eisen-(III)-chlorid zu dem roten Eisenthiocyanat (Eisenrhodamin-Komplex) umgesetzt (4), der ein Absorptionsmaximum bei 460 nm aufweist (Abb.8) . Der Komplex ist nur kurz stabil, weil er in 3 Stunden über 20% der Extinktion einbüßt, so daß die Extinktion sofort nach Reaktionsende zu bestimmen ist. Optimale Werte ergeben sich nur zwischen pH 9 - 11, wobei bei pH 9,0 ein $\varepsilon_{460\ nm}$ von 2,53 x 10^6 cm^2 x mol^{-1} gemessen wird (SÖRBO 1957a). Der Nachweis ist bis zu 1,2 mM Thiocyanatzugabe linear.

Die vorliegenden Bedingungen (2.2.6) waren wegen der geringen internen Reaktion von Kaliumcyanid und Thiosulfat, sowie der hohen Giftigkeit von Kaliumcyanid gewählt worden.

Cyanid kann in einer vorgeschalteten Reaktion mit einigen Ionengruppen zu Thiocyanat reagieren, so daß die Spezifität des Testes eingeschränkt ist. Am häufigsten setzt man Thiosulfat zu Thiocyanat nach (5) um (SÖRBO 1957b), wobei die Reaktion durch Kupfer-II-ionen, hohe Temperaturen und hohe pH-Werte beschleunigt wird (MILLER und CONN 1980). Aber auch Sulfide, wie Thiocystein (FLETCHER und ROBSON 1963), Polysulfide und Polythionate, wie Alaninthiocyanat (= Cyanoalanin ; CAVALLINI et al. 1958) reagieren mit Cyanid zu Thiocyanat (SÖRBO 1957a; FOSS 1950), wohingegen Disulfide, Peroxidionen und Mercaptide keine Reaktion auslösen (BARTLETT und SKOOG 1954).

Abgesehen von der Bildung des roten Eisenrhodamin-Komplexes können bei der Reaktion von Thiolen mit dem Eisenreagenz rotgefärbte Komplexe entstehen, die eine Thiocyanatbestimmung erschweren (SÖRBO 1957b). Dazu gehört auch Mercaptopyruvat (TANIGUCHI und KIMURA 1974), das ein anders geartetes Spektrum (Abb. 8) aufweist, dessen Absorptionsmaximum für 20 mM von 412 nm auf 392 nm bei 1 mM

wandert. Auch kann eine zeitlich bedingte Verschiebung des Maximums von 412 nm nach 427 nm in 2 Stunden gefunden werden. Cystein und Schwefelwasserstoff ergeben einen anderen Eisenkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei 388 nm zu liegen kommt.
Die Reaktionen (4) und (5) können durch Phosphat (10 mM) bis zu 20% gehemmt werden und dabei die Bildung des Eisenrhodamin-Komplexes herabsetzen (SÖRBO 1957a). Auch Cysteinsulfinsäure hemmt den Nachweis (SÖRBO 1957b). Sulfitionen reagieren dagegen mit den Cu^{2+}-Ionen und führen so zu einem langsamen und unvollständigen Umsatz von Cyanid (SÖRBO 1957b).
Ist auch DTE im Testmedium enthalten, so kann reduziertes DTE Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren (38), welches für die Reaktion (4) unnütz ist.
Auf weitere Eigenschaften wird in den Kapiteln 3.4 und 3.5 eingegangen.

$$Fe^{3+} + DTE_{red.} \longrightarrow Fe^{2+} + DTE_{ox.} \qquad (38)$$

3.1.5 Ketogruppenbestimmung

Der Nachweis von Keto- und Aldehydgruppen wird mit Hydroxylaminderivaten über die Bildung von Hydrazonderivaten (2.2.10) durchgeführt.
Mit Phenylhydrazon untersuchte man die Reaktionsprodukte der Aminosäureoxidasen (3.3.3.2). Die Absorptionsmaxima liegen für Pyruvat (dem Oxidationsprodukt des Alanins) und für α-Keto-γ-methiolbutyrat (aus Methionin) bei 315 nm, für Thiosulfopyruvat (aus S-Sulfocystein) bei 318 nm, für Mercaptobutyrat (aus Homocystein) 319 nm, Sulfoessigsäure (aus Taurin) 320 nm, S-2-Keto-2-Carboxyäthylthiocystein (aus Cystin) 322 nm, Pyruvatäthylester (aus Cysteinäthylester) 327 nm, Mercaptopyruvat (aus Cystein) 330 nm und für Sulfopyruvat (aus Cysteinsäure) bei 340 nm.
Alle übrigen Ketogruppennachweise, sei es von Vergleichssubstanzen auf der Trisacryl GF05-Säule (3.2) oder der Mercaptopyruvatsulfotransferase sowie eigenen Kontrollmessungen wurden mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin nach 2.2.10.1 durchgeführt.
In Abb. 9 sind die Absorptionsspektren der wichtigsten Ketoverbindungen dargestellt. Prinzipiell ist die Lage des Absorptionsmaximums konzentrationsabhängig. So liegt es für 1 mM Pyruvat bei 453 nm und für 0,1 mM bei 447 nm und für 1 mM Mercaptopyruvat bei 411 nm und für 0,1 mM bei 454 nm. Auffallend ist, daß Mercaptopyruvat ein deutlich anderes Spektrum als die anderen Verbindungen auf-

weist, die von 434 - 453 nm ihr Maximum und eine Schulter bei 520 nm besitzen. Mercaptopyruvat zeigt dagegen nur ein flaches Maximum bei 454 nm und kann somit anhand des Spektrums vom Pyruvathydrazon unterschieden werden.

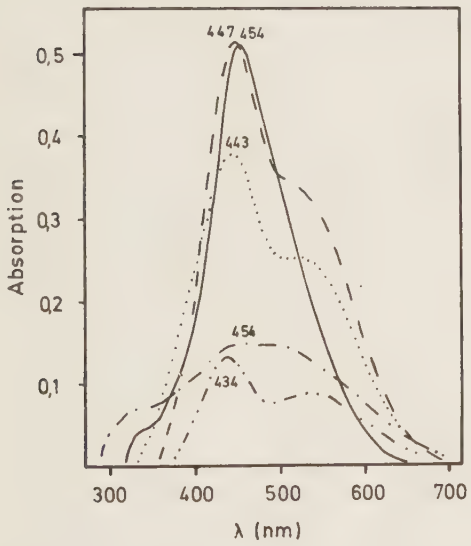


Abb. 9 : Absorptionsspektren von 2,4-Dinitrophenylhydrazonderivaten

Die angegebenen Ketoverbindungen wurden in 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 nach 2.2.10.2 nachgewiesen.

——— = Glyoxylsäure 0,1 mM
- - - = Pyruvat 0,1 mM
-.-.-. = Mercaptopyruvat 0,1 mM
-..-.. = Aceton 1 mM
..... = α-Keto-γ-Methiolbutyrat 0,1 mM

Die eigenen Absorptionsmaxima weichen z.T. von denen der Literatur ab und liegen für 0,1 mM Pyruvat bei 447 nm, im Gegensatz zu 358 nm (HEMMING und GABLER 1979) und 370 nm (KUN und GARCIA-HERNANDEZ 1957), für Mercaptopyruvat bei 454 nm, α-Keto-γ-Methiolbutyrat bei 443 nm, während HEMMING und GABLER (1979) 370 nm ermittelten, und Glyoxylsäure bei 454 nm, wo nach KRAMER et al. (1959) das Maximum bei 520 nm liegt. Der Nachweis ist für Aceton (434 nm bei 1 mM) unempfindlicher. L-Serin, Schwefelwasserstoff und Ammoniumionen zeigen kaum eine Hydrazonbildung.
Nur starke Oxidationsmittel beeinflussen den Nachweis negativ. Der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{520\ nm}$ für Pyruvat mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin beträgt $9{,}73 \times 10^6\ cm^2 \times mol^{-1}$. Wegen seiner hohen Empfindlichkeit (5 nmol = 1,3 µM) ist dieser Nachweis der Schwefelwasserstoffbestimmung überlegen.

3.2 Trenneigenschaften des Geles Trisacryl GF05

Vor drei Jahren erschien ein neues Gel, Trisacryl GF05, von der Firma LKB (Bromma, Schweden) auf dem Markt, das sich schon bald als sehr hilfreich für die in unserem Labor auftretenden Trennprobleme erwies. Dabei ist aber

Tab. 3 : Trenneigenschaften der Trisacryl GF05-Säule

Verbindung	Nachweis	Fraktion
a) anorganische Salze		
Natriumsulfid	1 , 6	27
Natriumsulfat	7	22
Natriumthiosulfat	5	26
Natriumcyanid	5[1]	41
Natriumthiocyanat	8	22
b) Mercaptide		
2-Mercaptoäthanol (ME)	1 , 4	45
2-Mercaptoäthansulfonsäure	1 , 4	25
3-Mercaptopyruvat	1 , 4 , 9	19
Thioglycolsäure	1 , 4	26
Thioessigsäure	1 , 4	27
1-Thioglycerin	1 , 4	43
2,3-Dimercapto-1-propanol (BAL)	1 , 4	46
1,4-Dithioerythritol (DTE)	1 , 4	48
Gluthation red. (GSH)	1 , 2 , 4	25
D-Cystein	1 , 2[1], 3 , 4	39
L-Cystein	1 , 2[1], 3 , 4	39
N-Acetyl-L-Cystein	3 , 4	25
L-Cysteinmethylester	1 , 2[1], 3 , 4	68
L-Cysteinäthylester	1 , 2[1], 3 , 4	70
D/L-Homocystein	1 , 2 , 4	42
Cysteamin	1 , 2 , 4	-- / 48*
L-Cystin	1 , 2[1]	43
L-Cystindiäthylester	1 , 2[1]	79
L-Homocystin	1 , 2	40
Cystamin	2[2]	-- / 85*
Glutathion ox. (GSSG)	1 , 2	23
c) Thioäther		
S-Methyl-L-Cystein	2	42
S-Äthyl-L-Cystein	2	41
S-Benzyl-L-Cystein	1 , 2	54
S-Carboxymethyl-L-Cystein	2	24
S-Carboxyäthyl-L-Cystein	2	24
S-Carbamoyl-L-Cystein	1 , 2[1], 3	45
α-Keto-γ-Methiolbutyrat	9	23
L-Methionin	2	41
L-Methioninamid	2	81
D/L-Äthionin	2	42
D/L-meso-Lanthionin	2	35
D/L,D/L-allo-Cystathionin	2[1]	40
L-Djenkolsäure	2[3]	36
Thiazolidin-4-carbonsäure	1	22
Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure	3	22
d) Sulfinsäure		
L-Cysteinsulfinsäure	2	25

Tab. 3 : Fortsetzung

Verbindung	Nachweis	Fraktion
e) Sulfonsäure		
Aminomethansulfonsäure	2	26
Taurin	2^4	-- / 41*
3-Amino-1-propansulfonsäure	2^5	37
L-Cysteinsäure	2	26
D/L-Homocysteinsäure	2	26
S-Sulfo-L-Cystein	1 , 2^1, 3	24
S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid	2	27
L-Methioninsulfoximin	2	41
L-Methioninsulfoxid	2	38
f) andere Verbindungen		
L-Alanin	2	38
ß-Cyano-L-Alanin	2^6	25
L-Serin	2	40
L-Phosphoserin	2	24
L-Asparagin	2^7	38
L-Asparaginsäure	2	24
Pyruvat	9	25
Glyoxylsäure	9	79

Die genannten Verbindungen (100 µmol) wurden in der unter 2.3.3 beschriebenen Weise aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte nach folgenden Verfahren :

1 = UV-Messung bei 260 nm gegen einen Wassernullwert. Die genaue Lage der Maxima wird bei KALLEN (1971a) beschrieben.

2 = Aminosäurebestimmung mit dem neutralen Ninhydrinreagenz (2.2.3.1) bei 570 nm
2^1 = Messung bei 460 nm ; 2^2 = bei 362 nm ; 2^3 = bei 436 nm; 2^4 = bei 375 nm;
2^5 = Nachweis nach Auftragen auf Whatmann-3-Papier, anschließendes Sprühen mit 0,5 % äthanolischer Ninhydrinlösung und Erhitzen (3.1.1); 2^6 = Messung bei 570 nm aber kein Maximum zwischen 350 nm und 700 nm ; 2^7 = bei 560 nm.

3 = Cystein und -derivatenachweis mit dem sauren Ninhydrinreagenz (2.2.3.2) bei 560 nm.

4 = Thiolbestimmung mit DTNB (2.2.4).

5 = Thiosulfatnachweis als Eisenrhodamin-Komplex (2.2.7) bei 460 nm.
5^1 = Cyanidnachweis mit dem gleichen Verfahren, dem aber 10 µmol Thiosulfat und nicht Cyanid vorgegeben wurden.

6 = Schwefelwasserstoffbestimmung als Methylenblau bei 670 nm (2.2.5).

7 = Radioaktivitätsbestimmung als (^{35}S)-Sulfat (2.2.9).

8 = Thiocyanatbestimmung bei 460 nm (2.2.6).

9 = Ketogruppennachweis bei 520 nm (2.2.10.2).

-- / --* = Fraktion des Gradienten

nicht die vom Hersteller IBF (Pointet Girard, Villeneuve-la-Garenne, Frankreich) beschriebene Eignung zur Gelfiltration für Substanzen mit einem Molekulargewicht zwischen 200 - 2500 Dalton, sondern ein spezifisches Binden nach Ionenaustauscherart von Nutzen, die bis heute nicht bekannt war.

3.2.1 Elutionseigenschaften

Aus den oben genannten Gründen wird das Trennverhalten für viele schwefelhaltige Verbindungen genau untersucht. Die Bedingungen der Säule (2.3.3) sind so gewählt, daß ein Einsatz zur Analyse von Hydrolyseprodukten des "Gaitonde-Testes" (3.3.1.2.2) oder von Reaktionsprodukten verschiedener Enzyme (3.7.3.1) möglich ist.

Die in Tab. 3 dargestellten Trennergebnisse werden alle mit 20 mM Tris-HCl pH 8,0 durchgeführt, da die Enzymteste von 3.7.3.1 unter gleichen pH-Bedingungen vorgenommen werden und die Reaktionsprodukte direkt auf die Säule aufgetragen werden können. Bei präparativen Säulenläufen empfiehlt es sich, 20 mM Triäthylaminpuffer pH 8,0 zu verwenden, da dieser Puffer beim Einengen am Rotationsverdampfer vollständig entfernt werden kann und die getrennte Substanz salzfrei erhalten wird.

Die einzelnen Verbindungen können mit verschiedenen Nachweisverfahren bestimmt werden, wie dies in Tab. 3 angegeben wird. Mercaptide erkennt man schon am Durchflußphotometer, da die Thiol-Gruppen bei 254 nm und 260 nm, wo sie nochmals nachgemessen werden, gut absorbieren. Zudem reagieren sie mit dem Ellman-Reagenz (2.2.4). Alle Aminosäuren weist man mit dem normalen Ninhydrintest (2.2.3.1) nach, wobei aber einige Verbindungen, wie unter 3.1.1 beschrieben nicht den üblichen Ruhemann-Komplex (Diketohydrindyliden-diketohydrindamin) ergeben. Einige Verbindungen können mit dem sauren Ninhydrintest (2.2.3.2) nachgewiesen werden, dessen Spezifität unter 3.3.1.2.1 näher erläutert wird.

Zur vereinfachten Darstellung der Ergebnisse werden im Folgenden nur die Fraktionen, in denen das Elutionsmaximum liegt, und nicht das Elutionsvolumen angegeben (Tab. 3).

Unter unseren Laufbedingungen kann eine Trennung gemäß einer Gelfiltration zwischen den Fraktionen 17 und 22 beobachtet werden. Große Moleküle, wie Dextranblau, Ferritin (MG 450 000) und Rinderserumalbumin (MG 68 000) werden in Fraktion 17, Salze, wie (^{35}S)-Natriumsulfat, werden in Fraktion 22 eluiert. Es ist auffallend, daß sehr viele schwefelhaltige Verbindungen weit hinter dieser Salzfraktion eluiert werden, was nur durch spezifische Wechselwirkungen der Substanzen mit dem Gel gedeutet werden kann. Ein verzögertes Elutionsverhalten scheint von mehreren Faktoren abzuhängen.

Betrachtet man schwefelhaltige Aminosäuren, so spielt die Kohlenstoffkettenlänge , wie bei Cystein (Fr. 39) und Homocystein (Fr. 42) gezeigt, eine Rolle. Oxidierte Schwefelverbindungen mit einer freien $-SO_2^-$ oder $-SO_3^-$-Gruppe und freien Carboxylgruppen, scheinen geringe Wechselwirkungen zu haben, wie dies für Cysteinsulfin- und Cysteinsulfonsäure (Fr. 25 bzw. 26) oder S-Carboxymethyl- bzw. -äthylcystein (Fr. 24) beobachtet wird. Das Verestern der Carboxylgruppe, wie bei Cysteinestern (Fr. 68 oder 70), verzögert die Elution stark, während die Abspaltung dieser Gruppe eine so starke Bindung bewirkt, daß sie erst nach Anlegen eines Salzgradienten, wie bei Cysteamin (Fr. --/48*), gelöst werden kann. Thioäther, wie Methionin und S-Methylcystein, werden in Fraktion 41 eluiert, wohingegen eine weitere Aminogruppe eine starke Verzögerung, wie bei Methioninamid (Fr. 81), bewirkt. Mercaptide, wie DTE, BAL, ME und Mercaptoessigsäure, werden in einer Gruppe zwischen den Fraktionen 43 - 48 eluiert. In Abb. 10 wird das Elutionsverhalten von S-Sulfocystein, L-Cystein und DTE dargestellt, die für die weiteren Untersuchungen 3.7.3 und 3.7.5 von Bedeutung sind.

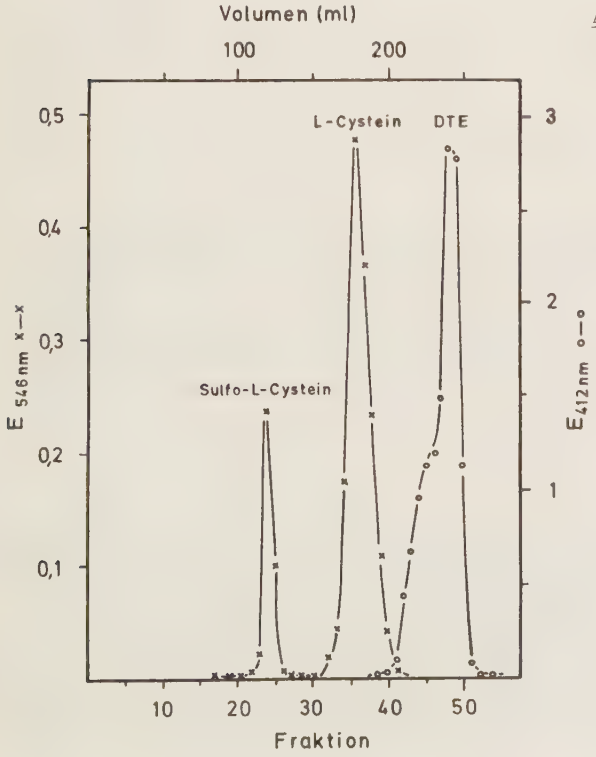


Abb. 10 : Elutionsverhalten von Cystein, S-Sulfocystein und DTE

1 µmol L-Cystein; 1 µmol S-Sulfo-L-Cystein und 10 µmol DTE wurden in 1 ml 20 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst, auf die Trisacryl GF05-Säule aufgetragen (2.3.3) und mit 20 mM Tris-HCl pH 8 eluiert. Die Fraktionen von 2,5 ml wurden mit dem DTNB-Reagenz (2.2.4) auf DTE (o —— o) und mit dem sauren Ninhydrin-Reagenz (2.2.3.2) auf L-Cystein und S-Sulfo-L-Cystein (x —— x) ausgemessen.

3.2.2 pH-Einfluß auf das Trennverhalten

Der Einfluß des pH-Wertes auf das Trennverhalten wird in Abb. 11 für S-Sulfocystein, L-Cystein und DTE untersucht. Dazu wird sowohl ein 20 mM Tris/HCl-Puffer für die pH-Werte 8 und 10, wie auch ein 20 mM Acetatpuffer für pH 5 verwendet.

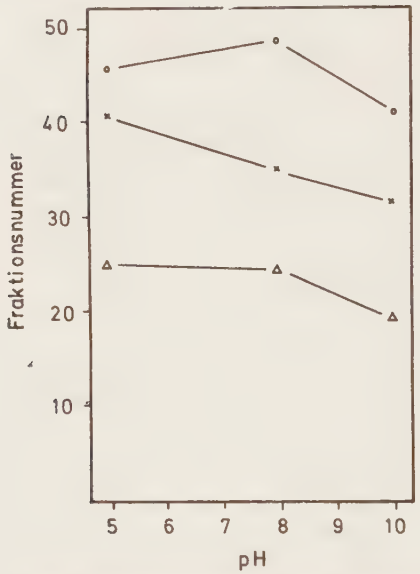


Abb. 11 : Einfluß des pH-Wertes auf die Trenneigenschaften der Trisacryl GF05-Säule

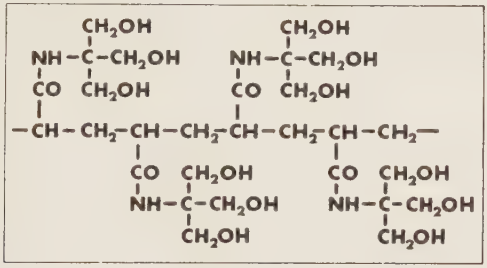
Es wurden je 100 µmol L-Cystein (x — x), S-Sulfo-L-Cystein (Δ — Δ) oder DTE (o —o) in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst und auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit 20 mM Natriumacetat/Essigsäure-Puffer pH 5,0 oder 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 oder 10,0. Die Substanzen wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, nachgewiesen.

S-Sulfocystein wird durch die pH-Änderung in seinem Elutionsverhalten nicht gestört, während DTE und Cystein aufgrund der pK-Verhältnisse der Seitengruppen sehr wohl beeinflußt werden. Bei pH 5 kann sogar O-Acetylserin eluiert und von Cystein getrennt werden, was bei Analysen der Cysteinsythaseansätze 2.5.1 von Nutzen sein kann, da sich dieses ab pH 7,5 zu N-Acetylserin umlagert, und somit der Detektion mit den beschriebenen Methoden entzieht.

3.2.3 Diskussion

Die Trenneigenschaften der Säule sollen im Folgenden diskutiert werden, wobei auch auf die Arbeit von KRAUSS und SCHMIDT (1983) verwiesen wird, die das Verhalten von gewöhnlichen Aminosäuren und Nukleotiden abhandelt.
Bei dem ungewöhnlichen Trennverhalten des Trisacryl GF05-Geles, das eigentlich zum Entsalzen von Proteinen und zur Gelfiltration von 200 - 3 000 Dalton konzipiert war, scheinen mehrere Faktoren eine Rolle zu spielen, deren Einfluß

nicht leicht abzuschätzen ist. Ausgangspunkt der Überlegungen muß die chemische Struktur des Geles (XII) sein, das drei primäre Alkoholgruppen und eine sekundäre Aminfunktion trägt.



(XII)

Unter den von uns gewählten Säulenbedingungen kann ein Elutionsverhalten gemäß einer Gelfiltration nur für wenige Verbindungen wie Dextranblau, Ferritin, Rinderserumalbumin und Natriumsulfat beobachtet werden (Fr. 17 - 22), während kleine Peptide, wie reduziertes und oxidiertes Glutathion schon etwas verzögert werden.

Das Laufverhalten der meisten eingesetzten Verbindungen wird anscheinend von den Ladungsverhältnissen und der Kohlenstoffkettenlänge bestimmt, wobei das Gel in gewissem Maße Ionenaustauscherfunktionen zeigt. Die Ladungsverhältnisse sind von den pK_s-Werten der einzelnen Gruppen abhängig. Unter den gewählten Standardbedingungen (pH 8) liegen die Säuregruppen als $-SO_2^-$, $-SO_3^-$ und $-COO^-$ vor, da ihr pK-Wert zwischen 1 und 2,5 beträgt. Die Aminogruppen sind meist protoniert, da der pK-Wert meist über pH 8,0 liegt. Trägt eine Verbindung zusätzliche geladenen oder polarisierte Gruppen, so üben diese auch einen Einfluß aus. Thiole liegen bei pH 8,0 noch als -SH vor. Eine genaue Diskussion des Laufverhaltens einzelner Verbindungen anhand des pK-Wertes ist nur selten möglich, da dieser nur für einige Substanzen in der Literatur (MAHLER und CORDES 1966) beschrieben ist.

Prinzipiell werden Verbindungen mit negativen Ladungen kaum und solche mit positiven Ladungen stark verzögert. Bei Aminosäuren, die unter den pH-Bedingungen als $H_3^+N\text{-}R\text{-}COO^-$ vorliegen, werden die Wechselwirkungen mit dem Gel durch eine gewisse Mesomerie von $-NH_3^+$ und $-COO^-$-Gruppe gemildert, sofern diese Gruppen relativ benachbart sind. So werden aliphatische Aminosäuren (KRAUSS und SCHMIDT 1983), wie auch Cystein und Homocystein, zwischen den Fraktionen 36 - 42 eluiert. Tragen Aminosäuren noch zusätzlich negative Reste, wie

S-Sulfocystein oder Cysteinsäure, werden sie fast ohne Verzögerung eluiert (Fr. 25). Zusätzliche positive Reste, wie bei Methioninamid (Fr. 81), verstärken die Bindung. Ist die Aminogruppe, wie bei N-Acetylcystein (Fr. 25), maskiert, so wird ihr Einfluß aufgehoben. Ein Verestern der Carboxylgruppe dagegen führt zu einer noch stärkeren Verzögerung, wie dies für Cysteinmethyl- bzw. -äthylester (Fr. 68 bzw. 70) gezeigt werden kann. Ein Abspalten der Carboxylgruppe, wie bei Cysteamin (Fr. --/48*) oder Cystamin (Fr. --/85*), bewirkt eine so starke Bindung, daß diese erst durch einen Salzgradienten gelöst werden kann. Eine zweite Komponente muß die Kohlenstoffkettenlänge zwischen den geladenen Gruppen sein. Cystein und Homocystein, nur durch eine $-CH_2$-Gruppe unterschieden, zeigen eine andere Bindung (Fr. 39 bzw. Fr. 40). wie dies auch für Aminomethansulfonsäure und Taurin (Fr. 26 bzw. --/41*) zutrifft. Die Ladungsverhältnisse sind für Cystein und Homocystein bei pH 8 fast gleich, da Cystein pK-Werte von 1,71 ($-COO^-$), 8,87 (-SH), 10,73 ($-NH_3^+$) und Homocystein von 2,22 , 8,87 und 10,86 hat. Somit müssen, mit der Kohlenstoffkettenlänge verbunden, sterische Verhältnisse eine Rolle spielen. Dies tritt deutlich bei den nur um jeweils eine $-CH_2$-Gruppe verlängerten Verbindungen Aminomethansulfonsäure, Taurin und 3-Amino-1-propansulfonsäure (Fr. 26, --/41* und 37) zu. Schließlich sei noch auf den geringen Einfluß aliphatischer Seitengruppen an Thiolen und Thioäthern, wie bei S-Methyl- bzw. -äthylcystein oder Methionin und Äthionin,hingewiesen (Fr. 42, 41 und 41, 42).

Da bisher nur wenige Verfahren beschrieben wurden (FRIMPTER et al. 1963, PURDIE et al. 1966, UBUKA et al. 1980a) die schwefelhaltige Aminosäuren und Thiole ohne Derivatisierung trennen können, ist die Trisacryl GF05-Säule eine einfache und schnelle Methode zur analytischen und präparativen Trennung der genannten Verbindungen. Im Rahmen dieser Arbeit wird sie besonders zur Trennung von S-Sulfocystein und Cystein sowie von Proteinen und Schutzthiolen von großem Nutzen sein.

3.3 Cysteinnachweismethoden

Im Rahmen dieser Arbeit war es notwendig, über geeignete Nachweisverfahren für Cystein zu verfügen. Da der allgemeine Aminosäurenachweis mit Ninhydrin keine brauchbaren Ergebnisse (2.2.3.1) lieferte, galt es, andere Methoden zu verwenden. Dabei bot sich das von GAITONDE (1967) beschriebene Verfahren mit dem sauren Ninhydrinnachweis (3.3.1) ebenso wie enzymatische Nachweise mittels Cysteindesulfhydrasen (3.3.3), wie auch chromatographische und elektrophoretische Methoden (3.3.2) an.

3.3.1 Charakterisierung des sauren Ninhydrinnachweises

Obwohl schon seit mehr als 17 Jahren der saure Ninhydrinnachweis für Cystein bekannt ist, wurde bisher weder seine Struktur noch seine Eigenschaften näher untersucht. Im Folgenden sollen Versuche dargestellt werden, die diesen Nachweis näher charakterisieren. Dabei wird dieses Nachweisreagenz als "Gaitonde-Komplex" bezeichnet, da GAITONDE (1967) diesen Nachweis erstmals für Cystein beschrieb.

3.3.1.1 Optimierung des Reaktionsansatzes

3.3.1.1.1 Inkubationstemperatur und -zeit

Obwohl diese beiden Parameter aus der Literatur (GAITONDE 1967) bekannt sind, sollte deren Einfluß auf die Bildung des Gaitonde-Komplexes untersucht werden. Ziel der in Tab. 4 zusammengefaßten Ergebnisse ist es, eine maximale Extinktion zu erhalten.

Tab. 4 : Optimieren von Inkubationstemperatur und -zeit

Inkubationstemperatur	Inkubationszeit bei der angegebenen Inkubationstemperatur		
	5 min	10 min	15 min
80°C	0,035	0,080	0,135
90°C	0,124	0,181	0,200
95°C	0,189	0,205	0,196
100°C	0,210	0,194	0,154

Der Test enthielt in 1 ml Endvolumen 100 µmol Tris-HCl pH 7,5; 100 nmol L-Cystein und 3 µmol DTE. Anschließend fügte man 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2) zu. Die Proben wurden nach der angegebenen Inkubationszeit bei der entsprechenden Temperatur im Eiswasser gekühlt und mit 2 ml n-Butanol versetzt. Man ermittelte die Extinktion bei 546 nm gegen einen Nullwert ohne Cystein.

Dabei scheint das Produkt aus Temperatur und Zeit entscheidend zu sein. Kurzes Erhitzen bei hoher Temperatur führt zu einer ebenso hohen Extinktion wie längeres Erhitzen bei niedrigeren Temperaturen. Für die weiteren Routineversuche sind 10 Minuten Inkubation in fast kochendem Wasser am geeignetsten, da hier Zeitfehler, wie sie bei großen Probenzahlen häufig auftreten, nicht so zum Tragen kommen.

3.3.1.1.2 Stabilisierung durch Lösungsmittel

Verfolgt man die Stabilität des Gaitonde-Komplexes nach Inkubationsende, so kann man eine sichtbare Extinktionsabnahme im Laufe der Zeit beobachten (Tab. 5). Diese Verluste versuchte man bisher durch Zugabe größerer Mengen Äthanols aufzuhalten (GAITONDE 1967; CHINARD 1952), Um diesen hohen Verbrauch zu reduzieren, suchte man das Lösungsmittel, welches den Komplex am besten stabilisierte.

Tab. 5 : Stabilisierung des Gaitonde-Komplexes durch verschiedene Lösungsmittel

Lösungsmittel	Extinktionsabnahme (%)
Wasser deionisiert	30 %
Methanol	29 %
Äthanol	34 %
1-Propanol	33 %
2-Propanol	12 %
1-Butanol	3 %
2-Butanol	4 %
tertiäres Butanol	9 %
Aceton	10 %
Benzol (organische Phase)	6 %

Der Testansatz enthielt in 1 ml Endvolumen 100 µmol Tris-HCl pH 7,5; 100 nmol L-Cystein und 3 µmol DTE. Nach Zugabe von 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2) wurde für 10 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend in Eiswasser gekühlt. Der Komplex wurde mit 2 ml des jeweiligen Lösungsmittels stabilisiert und seine Extinktion bei 546 nm sofort und nach 30 Minuten gegen einen Nullwert ohne Cystein ermittelt. Es wird die Extinktionsabnahme während dieser halben Stunde als Prozentsatz der Anfangsextinktion (0 min. nach Zugabe des Lösungsmittels) angegeben.

Aus Tab. 5 geht hervor, daß dies mit n-Butanol am besten erzielt werden kann, während Äthanol unter den gewählten Bedingungen (2 ml) keine Stabilisierung bewirkt. Eine Reduzierung des Lösungsmittels von 2 ml auf 1 ml zeigte bei n-Butanol z.B. eine negative Wirkung, da die Stabilität um 8,8% in 30 Minuten abnahm, wohingegen die Proben bis zur Messung in Eiswasser ohne Verluste aufbewahrt werden konnten. Obwohl die Wahl von n-Butanol die Stabilität des Komplexes am besten gewährleistet und somit die Zeit einer reproduzierbaren Messung verlängert, wird dies durch die Veresterung von n-Butanol mit Eisessig wieder eingeschränkt, die eine Trübung mit anschließender Phasentrennung bewirkt. Die zur Extinktionsbestimmung brauchbare Zeit hängt weitgehend von der Temperatur des Reaktionsgemisches bei Zugabe des n-Butanol ab. Gibt man n-Butanol direkt nach der Herausnahme aus dem Wasserbad zu, so tritt bereits nach 60 Minuten eine Veresterung ein, wohingegen eine kurze Kühlung im Eisbad erst nach 90 Minuten zur Veresterung führt. Deshalb wird bei Routinemessungen erst nach 5 Minuten Kühlen im Eisbad das n-Butanol hinzugegeben.

3.3.1.1.3 Zusammensetzung des Gaitonde-Reagenzes

Um die optimale Zusammensetzung zu ermitteln, mußte man zum einen das Verhältnis von Eisessig zu Salzsäure, zum anderen die Ninhydrinkonzentration verändern.

Aus Abb. 12 geht hervor, daß das Verhältnis von Eisessig zu Salzsäure von 7/3 die höchste Extinktion ergibt. Die Überprüfung der Absorptionsspektren ergab , daß ab diesem Verhältnis bis hin zu 10/0 ein zusätzlicher Peak bei 351 -349 nm auftritt, wie er auch für den reinen Gaitonde-Komplex (3.3.1.4.2) beobachtet werden kann. Der Komplex bildet in reinem Eisessig einen weiteren schwachen Peak bei 455 nm aus.
Eine Erhöhung der Ninhydrinkonzentration von 70 mM (2.2.3.2) zu 100 mM führt nicht zu einer Erhöhung, sondern einer Erniedrigung der Extinktion bei gleicher Cysteinkonzentration. Die Extinktion bei 100 mM Ninhydrin betrug für 50 nmol 61% und für 500 nmol L-Cystein 83% der Extinktion bei 70 mM Ninhydrin.

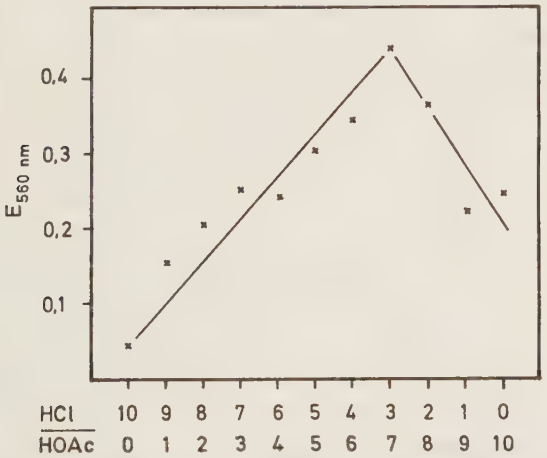


Abb. 12 : Verhältnis von Eisessig zu Salzsäure

Es wurden 100 nmol L-Cystein in 1 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 gelöst und mit 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2) des angegebenen Verhältnisses von Eisessig zu Salzsäure versetzt. Nach 10 Minuten Inkubation im kochenden Wasser gab man noch 2 ml n-Butanol hinzu und bestimmte die Extinktion bei 560 nm gegen einen Nullwert ohne Cystein.

3.3.1.1.4 Verhältnis von Ninhydrin zu Cystein

Es ist auch von Intersse, das minimale Verhältnis von Ninhydrin zu Cystein zu bestimmen, bei dem eine Bildung des Gaitonde-Komplexes noch möglich ist.
Dazu gab man zu 1 ml 1 mM L-Cystein eine steigende Menge von 0,1 M Ninhydrin-

haltigem Gaitonde-Reagenz und füllte mit dem Säuregemisch Eisessig/Salzsäure (4/1) auf 2 ml auf. Sodann bestimmte man die Extinktion und das Spektrum des Reaktionsproduktes nach 10 minütiger Inkubation bei 100°C.
Es zeigte sich, daß bis zu einer Endkonzentration von 37,5 mM Ninhydrin bei einer Endkonzentration von 0,5 mM L-Cystein der Gaitonde-Komplex noch gebildet werden kann. Geringere Ninhydrinmengen führten wohl noch zu einer Absorption, die aber nicht mehr von einem Gaitonde-Komplex stammt.
Es muß somit mindestens das Verhältnis von Ninhydrin zu Cystein von 65/1 bestehen, um den Nachweis mittels Gaitonde-Komplex möglich zu machen. Die in den meisten Versuchen verwendete Ninhydrinkonzentration im Gaitonde-Reagenz betrug mit 70 mM etwas mehr als das Minimum.

3.3.1.2 Eigenschaften des sauren Ninhydrinnachweises

3.3.1.2.1 Spezifität

Obwohl viele Autoren diese Methode zum spezifischen Nachweis von Cystein verwenden, zeigten schon GAITONDE (1967), HENSEL und TRÜPER (1981) sowie UBUKA et

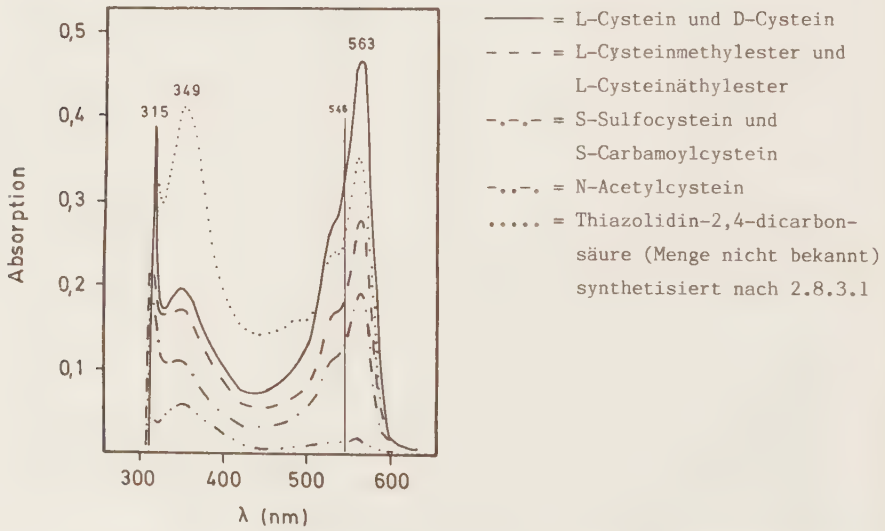


Abb. 13 : Absorptionsspektren der Cysteinderivate, die ein typisches Gaitondespektrum ergeben

Zu 100 nmol der angegebenen Verbindung, gelöst in 1 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, gab man 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2), erhitzte 10 Minuten bei 100°C, kühlte kurz ab und gab 2 ml n-Butanol hinzu. Das Spektrum wurde gegen einen Nullwert ohne Aminosäure gemessen.

Tab. 6 : Spezifität des Gaitonde-Reagenzes

Die Verbindungen können in 3 Gruppen eingeteilt werden, die unterschiedlich mit dem Gaitonde-Reagenz reagieren.

a) Ein typisches Gaitonde-Spektrum (Abb. 2) zeigen (Abb. 14) :
L-Cystein, D-Cystein, S-Sulfo-L-Cystein, N-Acetyl-L-Cystein, L-Cysteinmethylester, L-Cysteinäthylester, S-Carbamoyl-L-Cystein, Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure, Selenocystein (NG und ANDERSON 1978a), S-Sulfothiocystein (UBUKA et al. 1980a),vermutlich Thiocystein und unbekannte cysteinfreisetzende Verbindungen aus Chlorella, Synechococcus, Lemna und Spinat (3.6).

b) Kein Gaitonde-, aber ein anderes Spektrum zeigen (Abb.13) mit ihren Absorptionsmaxima () :

S-Benzyl-L-Cystein	(563, 482, 340, 313 nm) ;	L-Cystin	(561, 506, 455, 340, 313 nm)
DL,DL-allo-Cystathionin	(563, 493, 340, 313 nm) ;	L-Djenkolsäure	(560, 508, 461, 340, 313 nm)
DL-meso-Lanthionin	(454, 368, 315 nm) ;	Schwefelwasserstoff 2mM	(340, 313 nm)
Mercaptopyruvat	(481, 343, 314 nm) ;	Thiazolidin-4-carbonsäure	(563, 439, 319 nm)
Thioacetamid	(346, 325, 313 nm) ;	L-Prolin	(515, 481 nm)
2,6-Diaminopimelinsäure	(428, 357, 310 nm) ;	L-Tryptophan	(390, 320 nm)
Pipecolinsäure	(560 nm) (GAITONDE 1967)		

c) Kein Spektrum zwischen 400 - 750 nm zeigen bei 10 mM Konzentration der Verbindungen :
Cysteinsäure, Cysteinsulfinsäure, S-Methylcystein, S-Methylcysteinsulfoxid, Cysteamin, Cystindimethylester, Cystindiäthylester, S-Äthylcystein, Homocystein, Homocystin, Homocysteinsäure, Homocysteinthiolacton, Serin, Phosphoserin, O-Acetylserin, N-Acetylserin, Methionin, Methioninsulfon, Methioninsulfoxid, Äthionin, Taurin, Glycylcystein, Glutathion red. und ox., Mercaptoäthanol, DTE, Thioglycerin, Liponsäureamid, Äthanthiol, Mercaptoessigsäure, Mercaptopropionsäure, Aminomethansulfonsäure, Sulfaminsäure, Ammoniak, Alanin, Arginin, Lysin, Ornithin, α-Keto-γ-Methiolbutyrat, Cyanid, Thiocyanat; Selenocystin, S-Methylselenocystein und 2-Methylcystein (NG und ANDERSON 1978a);
nach GAITONDE (1967) zudem: Penicillamin, Ascorbinsäure, Glycin, Threonin, Leucin, Valin, Histidin, Äthanolamin, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Tyrosin, Phenylalanin, γ-Aminobuttersäure.

Je 1 µmol der genannten Verbindungen wurde in 1 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 unter Zusatz von 3 µmol DTE gelöst und mit 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2) versetzt. Die Proben wurden 10 Minuten bei 95°C inkubiert, abgekühlt und mit 2 ml n-Butanol versetzt. Die Extinktion bei 546 nm wurde gegen einen Nullwert ohne Zusatz gemessen.

al. 1980a), daß auch einige andere Verbindungen mit dem Reagenz nachgewiesen werden können.

Aus Tab. 6 geht hervor, daß es mehrere Verbindungen gibt, die das Absorptionsmaximum des Gaitonde-Komplexes (Abb. 2) aufweisen. Es handelt sich dabei um Cystein und seine Derivate, die durch Derivatisierung der Amino-, Carboxyl- und Thiolgruppe entstanden sind. Auf den Zusammenhang zwischen Thiazolidinderivaten und Cystein soll unter 3.6 näher eingegangen werden.

Außerdem bilden eine ganze Anzahl von Aminosäuren sowie Schwefelwasserstoff andersartige Produkte, deren Absorptionsmaxima aus Tab. 6 und Abb. 13 hervorgehen. Einige Verbindungen weisen ein ähnliches Spektrum auf, wie dies für Thioäther des Cysteins zutrifft. Eine Vielzahl von Verbindungen, die dem Cystein z.T. sehr nahe stehen, bilden keinen Gaitonde-Komplex, noch weisen sie irgendeine Absorption bei 560 nm auf. Dabei handelt es sich um Thioäther von Cystein wie S-Methylcystein, oxidierte Cysteinderivate wie Cysteinsäure, Homocystein und seine Derivate, Thiazolidin-4-carbonsäure, Thiole, viele Aminosäuren und Ammoniak, der mit dem normalen Ninhydrinnachweis positiv reagiert.

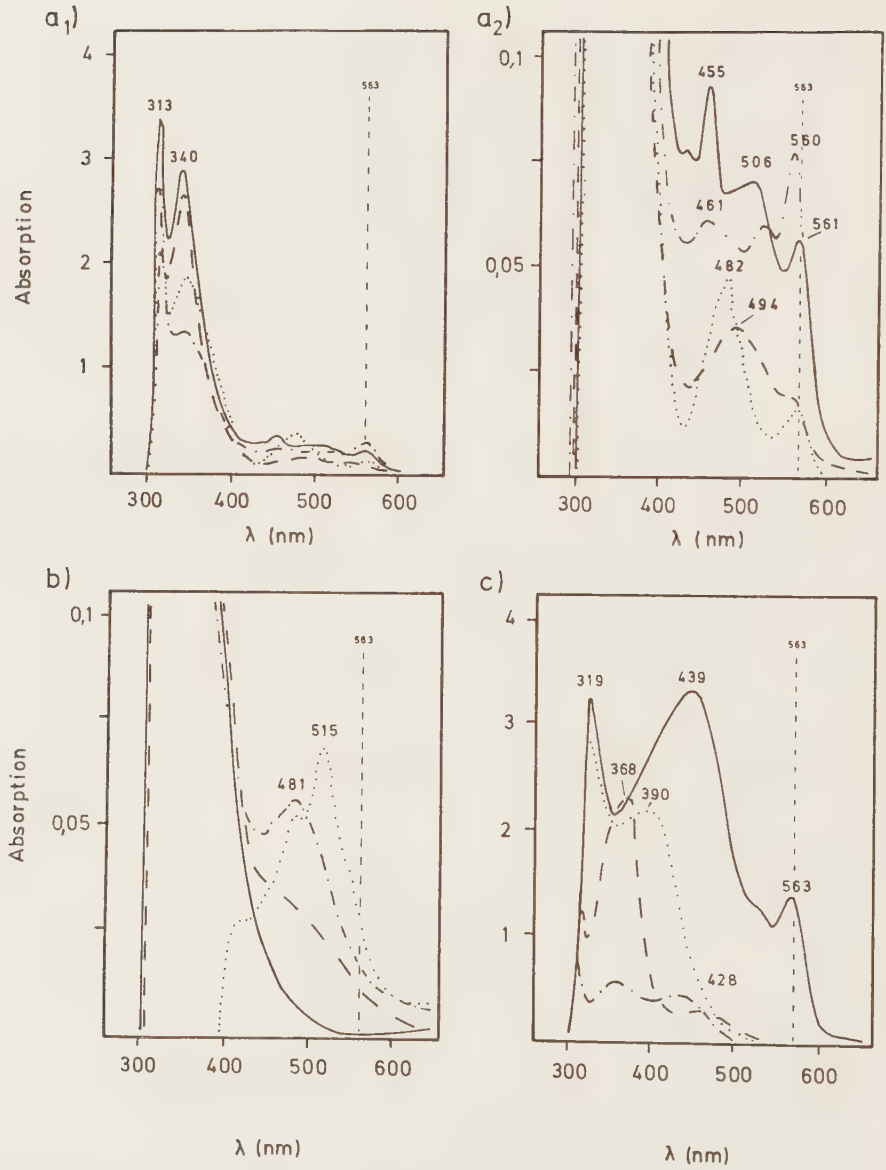


Abb. 14 : Legende siehe S. 67

Abb. 14 : Absorptionsspektren von Verbindungen, die beim sauren Ninhydrinnachweis (2.2.3.2) andersfarbige Reaktionsprodukte ergeben

a) a_2 stellt den entscheidenden Bereich von a_1 vergrößert dar.

———	L-Cystin	- - - -	DL,DL-allo-Cystathionin
-.-.-.-	L-Djenkolsäure	.....	S-Benzyl-L-Cystein
b) ———	Schwefelwasserstoff 2 mM	- - - -	Thioacetamid
-.-.-.-	Mercaptopyruvat	.....	L-Prolin
c) ———	Thiazolidincarbonsäure	- - - -	D/L-meso-Lanthionin
-.-.-.-	Diaminopimelinsäure	.....	L-Tryptophan

Es wurden je 1 µmol der angegebenen Verbindungen in der in Abb. 12 angegebenen Weise mit dem Gaitonde-Reagenz versetzt. Die Spektren wurden gegen einen Nullwert ohne die Verbindungen aufgenommen.

3.3.1.2.2 Hydrolyse der Gaitonde-positiven Cysteinderivate

Nachdem nun gezeigt worden ist, daß mehrere Cysteinderivate auch mit Ninhydrin unter sauren Bedingungen reagieren, galt es zu klären, ob diese Unspezifität auf der direkten Reaktion mit Ninhydrin beruht oder ob die Derivate durch das Säuregemisch Essigsäure/Salzsäure (4/1) zu Cystein hydrolisiert werden, welches spezifisch mit Ninhydrin einen Gaitonde-Komplex bildet. Aus Tab. 7 geht hervor, daß es sich vorwiegend um eine Hydrolyse handelt, da alle Verbindungen zumindest teilweise zu Cystein gespalten werden, welches auf der Trisacryl GF05-Säule abgetrennt werden kann und mit dem Gaitonde-Reagenz reagiert. Zudem kann diese Spaltung mit der Dünnschichtelektrophorese (2.3.2) des Hydrolyseansatzes bestätigt werden. Die in Tab. 8 genannten Enantiomerenverhältnisse, die mit der L- bzw. D-spezifischen Cysteindesulfhydrase (2.5.3.1 bzw. 2.5.3.2) ermittelt wurden, können nicht als gesichert gelten, da sie nur aus 2 Ansätzen gewonnen wurden.

L- und D-Cystein werden unter den Hydrolysebedingungen nicht verändert, wenngleich auch geringe Mengen des entgegengesetzten Enantiomeres auftreten. S-Sulfocystein wird zu Cystein und einer unbekannten negativ geladenen Verbindung gespalten. Die schon anfangs nicht reinen Cysteinester bilden bei Hydrolyse Cystein und eine negativ geladene unbekannte Substanz. Obwohl N-Acetyl-L-Cystein wie alle N-substituierten Aminosäuren schlecht mit dem neutralen Ninhydrinreagenz (2.2.3.1) nachweisbar ist, kann es mit dem Gaitonde-Reagenz bestimmt werden, da es zu Cystein hydrolisiert wird. Die Ergebnisse für S-Carbamoyl-L-Cystein sind sehr widersprüchlich, doch scheint L-Cystein gebildet zu werden. Zudem tritt meist eine negative unbekannte Verbindung auf. Die Hydrolyse von Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure ergibt Cystein, wozu aber eine längere Inkubationszeit nötig war. Alle anderen in Tab. 6 genannten Gaitonde-positiven Verbindungen konnten nicht auf ihre Hydrolyseeigenschaften untersucht werden.

Tab. 7 : Hydrolyse der Cysteinderivate

Verbindung	Trisacryl GF05-Säule			Dünnschichtelektrophorese		
	vor Hydrolyse Fr.	nach Hydrolyse Fr.	L-Cys/D-Cys	Relation der Fraktionen	vor Hydrolyse R_e	nach Hydrolyse R_e	Nachweis
L-Cystein	39	39	91/ 9 %	-	-1,0	-1,0 (Cys)	b
D-Cystein	39	39	14/86 %	-	-1,0	-1,0 (Cys)	b
S-Sulfo-L-Cystein	24	24,39	98/ 2 %	38%/62%	+1,2	+1,2 ($CysSO_3$) -1,0 (CySH) +-,0 ( )	b
L-Cysteinmethylester	68*	39	88/12 %	54%/46%	-2,5	-1,0 (CySH) +1,4 ( )	a b
		46	93/ 7 %				
L-Cysteinathylester	70*	39	98/ 2 %	41%/59%	-2,4	-1,0 (CySH) +1,3 ( )	a b
		46	f/f				
N-Acetyl-L-Cystein	25	25,39	f/f	47%/53%	+2,2	+2,2 (N-AcCySH) -1,0 (CySH)	b/c
S-Carbamoyl-L-Cystein	45	39	88/12 %	-	-1,1	-1,0 (CySH) +1,2 ( )	a/b
Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure	18	18,39,00	f/f/f	84%/16%	)	f	b

Je 500 µmol eines Cysteinderivates wurden in 5 ml Wasser gelöst und mit 5 ml Eisessig/Salzsaure (4/1) 10 Minuten bei 100°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und mit 1 ml gesättigter Tris-Lösung auf pH 8,0 titriert und zu einem Endvolumen von 5 ml aufgefullt. Nun gab man 1 ml auf die Trisacryl GF05-Säule (2.3.3). Die einzelnen Fraktionen wurden mit dem sauren Ninhydrinreagenz (2.2.3.2) unter Zusatz von 3 µmol DTE ausgemessen. Es werden nur die Spitzenfraktionen angegeben. Die L- und D-Konfiguration der Cysteinfraktion wurde mit den unter 2.5.3 beschriebenen Cysteindesulfhydrasen ermittelt.

Parallel dazu wurde das Hydrolysat in der Dunnschichtelektrophorese (2.3.2) auf Celluloseplatten mit einem 0,1 M Citratpuffer pH 5,6 bei 1000 V für 30 Minuten aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte durch Spruhen mit a) 0,5% äthanolischer Ninhydrinlösung (2.3.1), b) mit dem Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2) oder c) mit einer 1 mM DTNB-Losung (2.2.4). Als Standard wurde Cystein R_e = -1 gesetzt, da es zur Kathode wanderte.

Die Hydrolyse von ca. 21 µmol Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure erfolgte für 45 Minuten bei 100°C, da diese Menge unter den obigen Bedingungen (10 min) kaum hydrolisiert war.

* = keine chemisch reine Substanz nach Trisacryl GF05 und Dünnschichtelektrophorese

f = fehlt o = nicht Fraktion 46 der Trisacryl GF05-Säule

3.3.1.2.3 Linearität

Aus Abb. 15 geht hervor, daß Cystein und Cysteinester annähernd gleiche Eichkurven besitzen, während S-Sulfo-L-Cystein geringere und N-Acetyl-D-Cystein erheblich geringere Extinktionen aufweisen. Der Linearitätsbereich dieser Eichkurven erstreckt sich für alle Cysteinderivate außer N-Acetyl-D-Cystein von 40 nmol bis 250 nmol. N-Acetyl-D-Cystein dagegen kann bis 1 µmol gemessen werden.

Bestimmt man dagegen die Ergebnisse am DU 7-Photometer (Beckman), so kann der Linearitätsbereich für L-Cystein bis 1,5 µmol ausgeweitet werden, da dieses

Gerät bis 4 O.D. linear ist.
Die dargestellten Eichkurven sind aber keine Fixkurven, da stets die Alterung des Gaitonde-Reagenzes berücksichtigt werden muß.

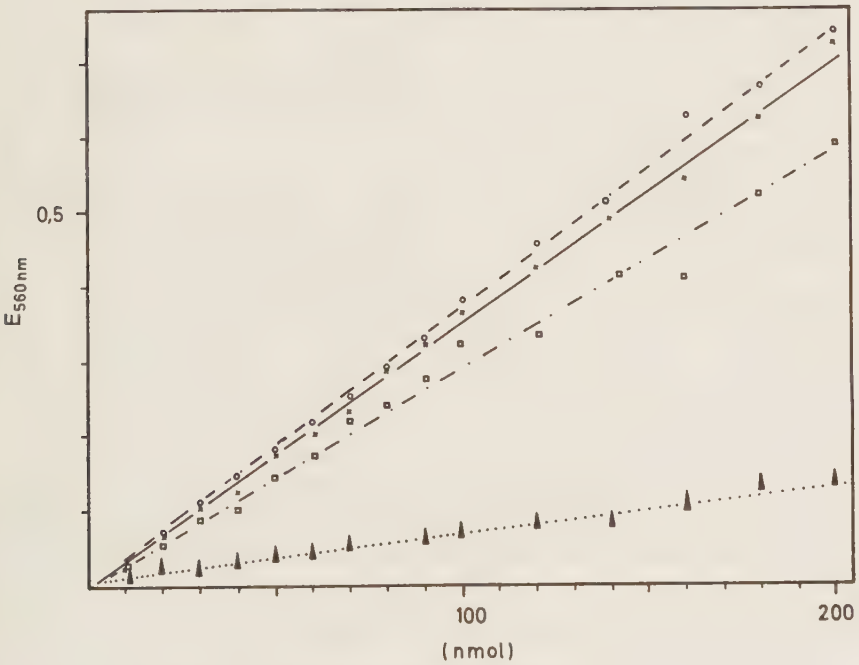


Abb. 15 : Eichkurven verschiedener Cysteinderivate

Die angegebene Menge an Cystein bzw. eines anderen -derivates wurde in 1 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 gelöst und mit 1 ml Gaitonde-Reagenz nach 2.2.3.2 und 2 ml n-Butanol versetzt. Alle Werte wurden gegen einen Nullwert ohne Cystein gemessen.

o—o D-Cystein x—x L-Cystein, L-Cysteinmethylester, L-Cysteinäthylester
□—□ S-Sulfo-L-Cystein ▲—▲ N-Acetyl-D-Cystein

3.3.1.2.4 Bestimmung des "molaren Extinktionskoeffizienten" bezüglich Cystein und seiner Derivate

Obwohl der molare Extinktionskoeffizient des sauren Ninhydrinnachweises bisher nicht bestimmt werden konnte (MEYER 1967), da das Molekulargewicht des Gaitonde-Komplexes nicht bekannt war (3.3.1.4.1), findet sich in der Literatur stets eine Angabe, die sich nur auf die eingesetzte Menge Cystein beziehen zu scheint.

In Tab. 8 wird für Cystein und seine Derivate dieses an sich unkorrekte ε angegeben. Es wurde aus 12 - 15 Konzentrationen im Eichbereich gewonnen. Während L-Cystein, D-Cystein und die beiden Cysteinester ähnliche molare Extinktionskoeffizienten besitzen, die alle im Bereich $\pm\sigma$ liegen, besitzt S-Sulfo-L-Cystein und im stärkeren Maße N-Acetyl-D-Cystein deutlich geringere Werte.
Trotz der Kenntnis dieser Werte müssen stets Eichwerte bei allen Bestimmungen mitgemessen werden, da die Alterung des Gaitonde-Reagenzes zu Meßfehlern fuhren kann.

Tab. 8 : Molarer Extinktionskoeffizient von Cystein und seinen Derivaten

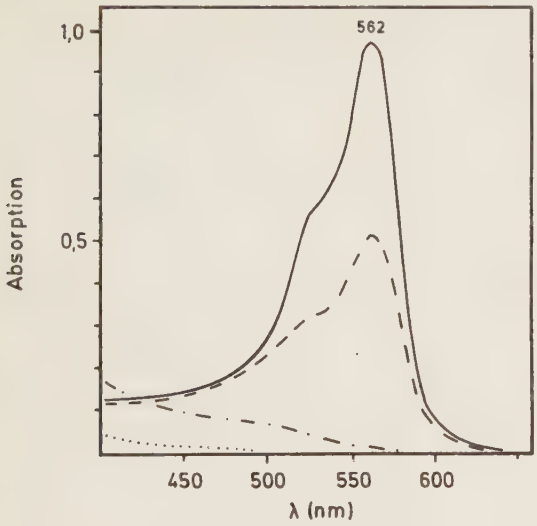
Verbindung	$\varepsilon_{546\ nm}$ (x 10^6 cm^2 x mol^{-1})	$\varepsilon_{546\ nm} \pm \sigma$	$\varepsilon_{560\ nm}$ (x 10^6 cm^2 x mol^{-1})	$\varepsilon_{560\ nm} \pm \sigma$
L-Cystein	10,11	9,72 - 10,48	13,98	13,48 - 14,44
D-Cystein	10,24	9,44 - 11,04	14,71	14,30 - 15,16
S-Sulfo-L-Cystein	9,09	5,32 - 12,84	11,92	11,08 - 12,76
L-Cystein-methylester	10,05	9,48 - 10,60	13,96	13,24 - 14,68
L-Cystein-äthylester	9,87	9,40 - 10,32	13,47	13,08 - 13,84
N-Acetyl-D-Cystein	2,15	1,88 - 2,40	2,80	2,52 - 3,08

Es wurden 250 nmol bis 40 nmol der jeweiligen Verbindung in 1 ml 0,1 M Tris-HCL pH 7,5 unter Zusatz von 2µmol DTE mit dem sauren Ninhydrinnachweis 2.2.3.2 gemessen. Für jeden Eichwert wurde der molare Extinktionskoeffizient bestimmt und daraus ein Mittelwert gebildet. Zum Vergleich wurde der Bereich $\varepsilon \pm \sigma$ verwendet. Alle Ergebnisse wurden am PM-2-Photometer (Zeiss) ermittelt, welches nur bis zu 1,5 O.D. linear ist.

3.3.1.2.5 Einfluß von Kationen auf die Komplexbildung

Die Gaitonde-Komplexbildung wird nur von Kobalt-(II)-, Eisen-(II)-, Eisen-(III)- und Kupfer-(II)-Salzen z.T. sehr stark gehemmt (Abb. 16 ; Tab. 9). Dabei kann für Kupfer-(II)-, Eisen-(II)- und Eisen-(III)-Kationen kein Gaitonde-Spektrum (Abb. 2) beobachtet werden. Auch die Zugabe von EDTA sowie das Weglassen von DTE sind ohne Wirkung . Alle anderen Kationen stören den Nachweis kaum.

Abb. 16 : Einfluß von Kationen auf die Komplexbildung



Die Spektren der in Tab. 9 genannten Versuche wurden gegen einen Nullwert ohne Cystein und Kation aufgenommen.

——— ohne Kation
- - - mit 2 mM $CoCl_2$
-.-.- mit 2 mM $FeCl_2$ bzw. $FeCl_3$
..... mit 2 mM $CuCl_2$

Tab. 9 : Einfluß von Kationen auf die Komplexbildung

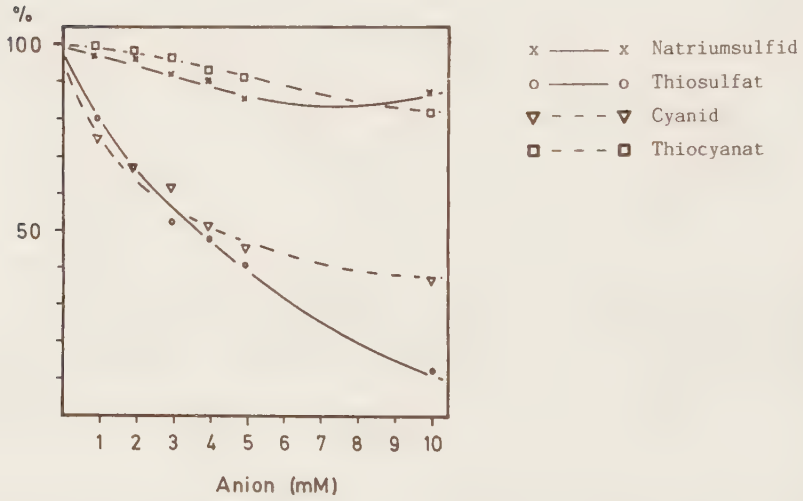
Kation	Extinktion bei 560 nm / %						
Wasser	0,945	100 %					
EDTA	0,953	101 %					
NaCl	0,620	102 %					
KCl	1,025	108 %					
$CaCl_2$	0,931	99 %					
$MgCl_2$	0,967	102 %					
$MnCl_2$	0,916	97 %					
$CuCl_2$	0,001	0 %	- DTE	0,001	0 %	+ EDTA	0,002	0 %
$NiCl_2$	1,022	108 %					
$CoCl_2$	0,480	51 %					
$ZnCl_2$	1,016	107 %					
$FeCl_2$	0,013	1 %	- DTE	0,013	1 %	+ EDTA	0,07	1 %
$FeCl_3$	0,021	2 %					
$AlCl_3$	0,919	97 %					

Der Testansatz enthielt in 1 ml Endvolumen 100 µmol Tris-HCl pH 7,5 ; 2 µmol DTE ; 100 nmol L-Cystein und 2 µmol des jeweiligen Kations. Anschließend gab man 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2) zu und inkubierte für 30 Minuten bei 100°C. Danach gab man 2 ml Butanol zu. Es wurde die Extinktion bei 560 nm gegen einen Nullwert ohne Cystein gemessen. Bei $CuCl_2$ und $FeCl_2$ erfolgte zudem ein Ansatz, der kein DTE oder zusätzlich 2 mM EDTA enthielt.

3.3.1.2.6 Einfluß von Anionen auf die Komplexbildung

Der Cysteinnachweis wird von Schwefelwasserstoff und in stärkerem Maße von Thiosulfat gehemmt (Abb.17), so daß bei den Enzymtesten 2.5.1 und 2.5.2 stets ein Eichwert mit Cystein bestimmt werden muß. Auch Cyanid und Thiocyanat beeinflussen die Gaitonde-Komplexbildung negativ.

Abb. 17 : Einfluß von Anionen auf den Cysteinnachweis mit dem sauren Ninhydrinreagenz



Es wurden Eichkurven von L-Cystein in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen an Sulfid, Thiosulfat, Cyanat bzw. Thiocyanat nach 2.2.3.2 bestimmt. Es werden die Mittelwerte der einzelnen Eichwertabweichungen bei der jeweiligen Ionenkonzentration dargestellt. Die Eichwerte ohne Ionenzusatz werden als 100 % angenommen.

3.3.1.2.7 Negative Interferenz

Der Cysteinnachweis wird von den verwendeten Puffern nicht erheblich gestört (Tab. 10). Von besonderem Interesse ist der Einfluß von Verbindungen auf die Gaitonde-Komplexbildung, die selbst diesen nicht bilden können (Tab. 11).

Die Ketosäuren Thioglycolsäure, Mercaptopyruvat und α-Keto-γ-Methiolbutyrat hemmen die Komplexbildung z.T. sehr erheblich (Abb. 18), wobei die Konzentration von Bedeutung zu sein scheint. Auch Aceton (3%) führt bei pH 7,5 zu einer Hemmung um 18 %, bei pH 9,0 aber zu einer leichten Steigerung (5%).

Tab. 10 : Einfluß von Puffern auf die Gaitonde-Komplexbildung

Puffer	Extinktion bei 560 nm	%
Tris	0,634	100 %
Phosphat	0,623	98 %
Imidazol	0,604	95 %
Tricin	0,598	94 %
HEPES	0,618	97 %

100 nmol L-Cystein wurden in 1 ml 0,1 M Puffer pH 8,0 mit 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2) versetzt. Die Proben wurden anschließend im Eiswasser abgekühlt. Sodann ermittelte man die Extinktion bei 560 nm gegen einen Nullwert ohne Cystein.

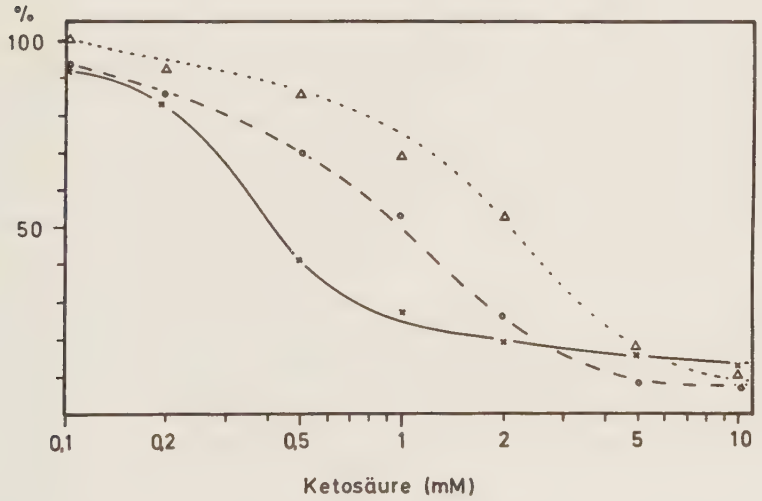


Abb. 18 : Einfluß von Ketosäuren auf den Cysteinnachweis mit dem sauren Ninhydrinreagenz

x —— x Mercaptopyruvat o - - - o Thioglycolsäure
Δ ••• Δ α-Keto-γ-Methiolbutyrat

Es wurden Eichkurven (20 - 500 nmol) von L-Cystein in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen an Thioglycolsäure, Mercaptopyruvat oder α-Keto-γ-Methiolbutyrat nach 2.2.3.2 bestimmt.

Diese Ergebnisse können Hinweise auf die Reaktionsfolge des sauren Ninhydrinnachweises sein. Auch ß-Cyanoalanin und O-Acetylserin zeigen eine Hemmung, die bei den entsprechenden Enzymtesten 2.5.8 und 2.5.1 bzw. 2.5.2 durch Eichwerte berücksichtigt werden müssen. Nur die Zugabe von N-Acetyl-Cystein erhöht den Cysteineichwert, da dieses selbst bei seiner Hydrolyse (3.3.1.2.2) Cystein freisetzt.

Tab. 11 : Einfluß von Gaitonde-negativen Verbindungen auf die Komplexbildung

zugesetzte Verbindung	Endkonzentration		
	10 mM	1 mM	0,1 mM
L-Homocystein	102,9 %	106,4 %	104,0 %
L-Homocystin	89,6 %	102,5 %	108,8 %
L-Cysteinsulfinsäure	91,1 %	93,0 %	95,4 %
L-Cysteinsäure	77,9 %	90,5 %	96,5 %
S-Methyl-L-Cystein	93,3 %	94,8 %	97,0 %
S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid	59,5 %	94,1 %	94,8 %
Thioglycolsäure	6,4 %*	53,7 %	94,0 %
Mercaptoäthanol	91,8 %	95,6 %	98,8 %
Mercaptopyruvat	12,2 %*	27,3 %	91,5 %
Pyruvat	93,5 %	99,6 %	94,7 %
Mercaptopropionsäure	84,9 %	93,1 %	97,8 %
Propionsäure	103,8 %	100,7 %	97,8 %
Sulfoessigsäure	100,0 %	100,1 %	96,2 %
Sulfopropionsäure	91,1 %	104,2 %	94,9 %
N-Acetyl-L-Cystein	123,7 %	106,0 %	104,0 %
ß-Cyanoalanin	75,4 %	90,6 %	93,3 %
L-Alanin	83,2 %	91,5 %	94,0 %
N-Acetyl-L-Serin	97,6 %	98,3 %	100,1 %
O-Acetyl-L-Serin	75,0 %	102,1 %	99,2 %
Phospho-L-Serin	95,6 %	96,0 %	100,0 %
L-Methionin	85,5 %	96,4 %	97,4 %
α-Keto-γ-Methiolbutyrat	11,1 %*	68,3 %	101,4 %
Cysteamin	86,3 %	90,9 %	102,3 %
Taurin	97,0 %	99,8 %	97,0 %
Glutathion red.	92,1 %	95,0 %	103,3 %
Ammoniak	103,4 %	98,6 %	101,5 %

Der Testansatz enthielt in 1 ml Endvolumen 100µmol Tris-HCl pH 7,5 ; 3 µmol DTE ; 100 nmol L-Cystein und die genannte Verbindung in angegebener Konzentration. Nach Zugabe von 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2) inkubierte man bei 100°C für 10 Minuten und bestimmte die Extinktion bei 560 nm gegen einen Nullwert ohne Cystein in Gegenwart der genannten Verbindung.

Die Extinktion bei 560 nm von L-Cystein betrug 0,678 und wurde zu 100 % gesetzt.

* = kein Gaitonde-Spektrum (Abb.2)

3.3.1.3 Aufreinigung des Gaitonde-Komplexes

3.3.1.3.1 Optimieren des Extraktionsmittels

Um das optimale Extraktionsmittel zu ermitteln, versuchte man den Gaitonde-Komplex in organische Lösungsmittel zu überführen, um den Komplex vom Ninhydrin, welches in der wässrigen Phase verblieb, und hydrophilen Verunreinigungen abzutrennen.

Dazu scheiden alle Alkohole wie Methanol, Äthanol, 1- bzw.2-Propanol, n- und iso-Butanol sowie Amylalkohol aus, da sie keine Phasentrennung mit dem Reaktionsgemisch ergeben. n-Hexan ist auch nicht geeignet, da sich der Gaitonde-Komplex in beiden Phasen finden läßt. Auch Ketone, wie Aceton oder Methyläthylketon, sind nicht geeignet, da sie nach kurzer Zeit den Komplex zerstören. Von den Aromaten ist nur Benzol, das den Gaitonde-Komplex mit typischem Spektrum (λ_{max} = 575 nm und Schulter bei 532 nm) extrahiert, zu empfehlen, während Toluol (λ_{max} = 571 nm) den Komplex ebenfalls nach einiger Zeit zerstört. Die Kohlenwasserstoffhalogenide, wie Methylenchlorid (λ_{max} = 566 nm), Chloroform (λ_{max} = 563 nm) und Tetrachlorkohlenstoff (λ_{max} = 560 nm) lösen den Komplex gut, wobei besonders Chloroform geeignet ist, da es auch ein braunes Reaktionsprodukt des Gaitonde-Komplexes, welches sich bei der Zerstörung des Komplexes bildet, in den ursprünglichen Gaitonde-Komplex zurückverwandelt. Auch Diäthyläther (λ_{max} = 560 nm) und Äthylacetat (λ_{max} = 560 nm) können eingesetzt werden.

Für die präparative Aufreinigung (2.4.1.1) wird Diäthyläther eingesetzt, da dieser leicht flüchtig ist und somit die Zeit beim Einengen verkürzt werden kann. Kühlt man das Reaktionsgemisch zu schnell ab, so flockt eine rote Substanz aus, die nur schwer abgetrennt werden kann. Auch eine 10-fach höhere Cysteinkonzentration (500 ml:10 mM L-Cystein) bildet eine dunkelrote, metallisch glänzende Substanz, die sich in der Interphase ansammelt und nur schwer abtrennen läßt.

In Abb. 19 sind die Veränderungen des Spektrums des Gaitonde-Komplexes dargestellt. Während die breite Absorption im UV-Bereich bei der Extraktion abnimmt, erhöht sich stetig der typische Gaitonde-Peak bei 560 nm. Die Wasserphasen zeigen ein Absorptionsmaximum bei λ = 242 nm , sowie größere Mengen an UV-absorbierenden Substanzen, die zum Teil auch Ninhydrin enthalten müssen.

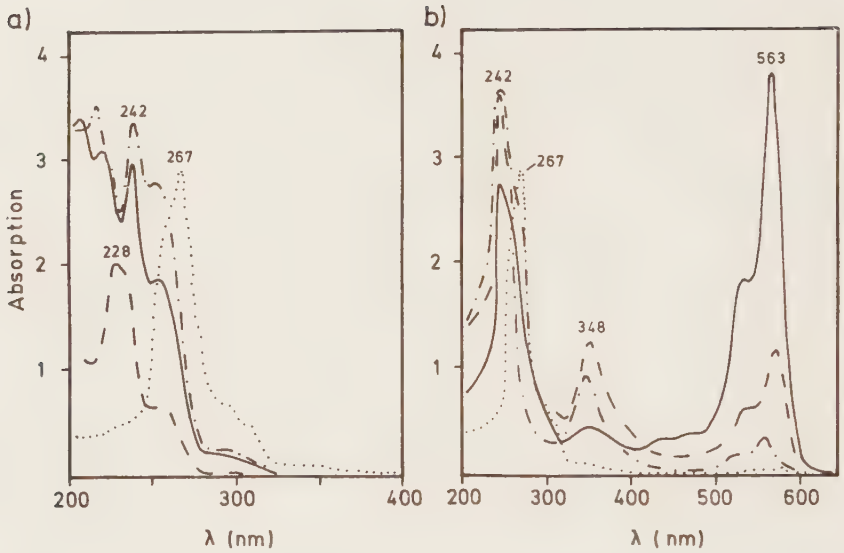


Abb. 19 : Absorptionsspektren der einzelnen Aufreinigungsschritte des Gaitonde-Komplexes

a) Wasserphasen

..... = Spektrum des Reaktionsansatzes von Ninhydrin und L-Cystein bei pH 0 gegen Eisessig/Salzsäure (4/1).

- - - = Säurephase nach Phasentrennung mit Diäthyläther gegen Eisessig/Salzsäure (4/1)

-.-.- = Wasserphase vor dem Neutralwaschen gegen Wasser

——— = Natriumbicarbonat-Waschlösung gegen Wasser

b) Ätherphasen

..... Spektrum des Reaktonsansatzes von Ninhydrin und L-Cystein bei pH 0 gegen Eisessig/Salzsäure (4/1).

-.-.- Diäthylätherphase nach Neutralisieren und Trocknen über Kalziumchlorid gegen Diäthyläther

- - - = Gaitonde-Komplex nach der 1. Dünnschichtchromatographie mit Chloroform/Aceton (9/1) , eluiert mit Chloroform und gegen dieses gemessen.

——— = Gaitonde-Komplex nach dem 3. Laufmittel Chloroform gegen dieses gemessen.

Die einzelnen Fraktionen wurden in der unter 3.3.1.3 beschriebenen Weise gewonnen und gegen den genannten Nullwert gemessen.

3.3.1.3.2 Verhalten in der Dünnschichtchromatographie

Um den Gaitonde-Komplex mit optimalen Trennsystemen aufreinigen zu können, muß mußte man die Laufeigenschaften des Gaitonde-Komplexes in verschiedenen Laufmitteln ermitteln (Tab. 12). Als Laufmittel scheiden Wasser wie auch Alkohole aus, da ersteres den Komplex nicht löst und letztere den Komplex zerstören (3.3.1.1.2).

Aus Tab. 12 geht hervor, daß mäßig unpolare Lösungsmittel wie Chloroform oder Benzol gute Trennungen ergeben. Das Laufmittel 1, Chloroform/Aceton (9/1), wird besonders deshalb gewählt (2.4.2.2), da hier einige UV-löschende Verunreingungen abgetrennt werden können. Die weiteren Laufmittel 2 und 3 werden verwendet, um auch die Reaktionsprodukte abzutrennen, die nicht an einer UV-Löschung erkennbar sind. Als Kriterium der Reinheit des Gaitonde-Komplexes werden nur das Spektrum (Abb.19), wobei das Verhältnis UV-Bande zur Gaitonde-Bande bei 560 nm entscheidend ist, und die UV-löschenden Banden der Dünnschichtchromatographie herangezogen.

Aus Abb. 19 geht hervor, daß die Aufreinigung nach der 1.Trennung kaum mehr zu einem reineren Gaitonde-Komplex führt, da das Verhältnis von 242 nm zu 560 nm annähernd gleich bleibt (Tab.13) und in der Dünnschichtchromatographie nurmehr eine Bande erscheint.

Tab. 12 : R_f-Werte des Gaitonde-Komplexes

Laufmittel	R_f-Werte
Petroläther (Sdp. 40°C - 65°C)	0,00
Tetrachlorkohlenstoff	0,00
Benzol	0,04
Methylenchlorid	0,16
Chloroform	0,75 Laufmittel 3
Äthylacetat	0,76
Diäthyläther	0,90
Tetrachlorkohlenstoff/Aceton	(9/1) 0,41; (1/1) 0,93
Benzol/Diäthyläther	(9/1) 0,37; (6/3) 0,65; (1/1) 0,85 Laufmittel 2
Benzol/Aceton	(9/1) 0,68; (1/1) 0,89
Benzol/Äthylacetat	(9/1) 0,46
Chloroform/Aceton	(9/1) 0,66 Laufmittel 1
Chloroform/Äthanol	(9/1) 0,94
Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff	(9/1) 0,54; (1/1) 0,20
Chloroform/Diäthyläther	(1/1) 0,82
Chloroform/ Äthylacetat	(1/1) 0,72

Es wurden selbstgezogene Kieselgel GF_{254}-Dünnschichtplatten (0,25 mm) verwendet (2.3.1), wobei die Glaskammern mit Filterpapier ausgeschlagen waren.

3.3.1.4 Eigenschaften des Gaitonde-Komplexes

3.3.1.4.1 Massenspektrometrie

Der nach 2.4.1.2 aufgereinigte Gaitonde-Komplex wurde einer Massenspektrometrie (2.3.6) unterzogen. Da der Gaitonde-Komplex beim Einengen am Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur bereits zum Teil zerstört wird, was an einem Farbumschlag von rot nach braun erkennbar ist, wurden die Proben zum einen fest (Abb. 20a), zum anderen nach Aufdampfen der Chloroform-Lösung (2.4.1.2) auf den Probenkopf im Stickstoffstrom ("flüssige Probe", Abb. 20b) in das Massenspektrometer eingeführt.
Aus beiden Proben kann reproduzierbar das Molekülion M^+ mit 503 m/e ermittelt werden. Die "flüssige Probe" enthält erheblich mehr schwerere Fragmente, wie 503 m/e, 359 m/e und 158 m/e, als die feste Probe, die andererseits mehr kleinere Fragmente, wie 74 m/e, 69 m/e, 50 m/e und 44 m/e, aufweist. Dies deutet auf eine teilweise Zerstörung des Komplexes zu kleineren Massen hin.

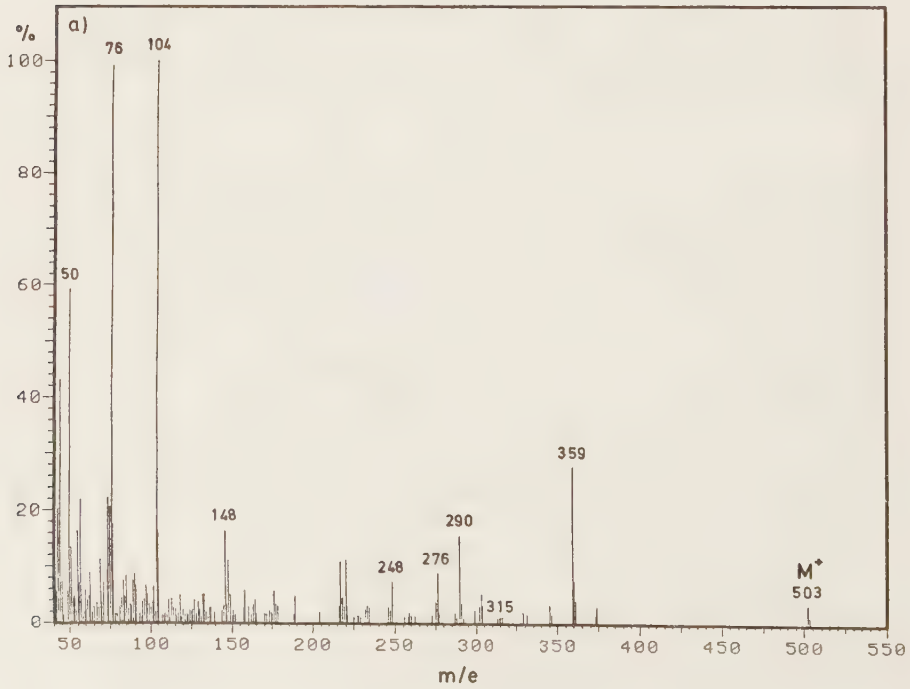


Abb. 20a : Massenspektrum des Gaitonde-Komplexes

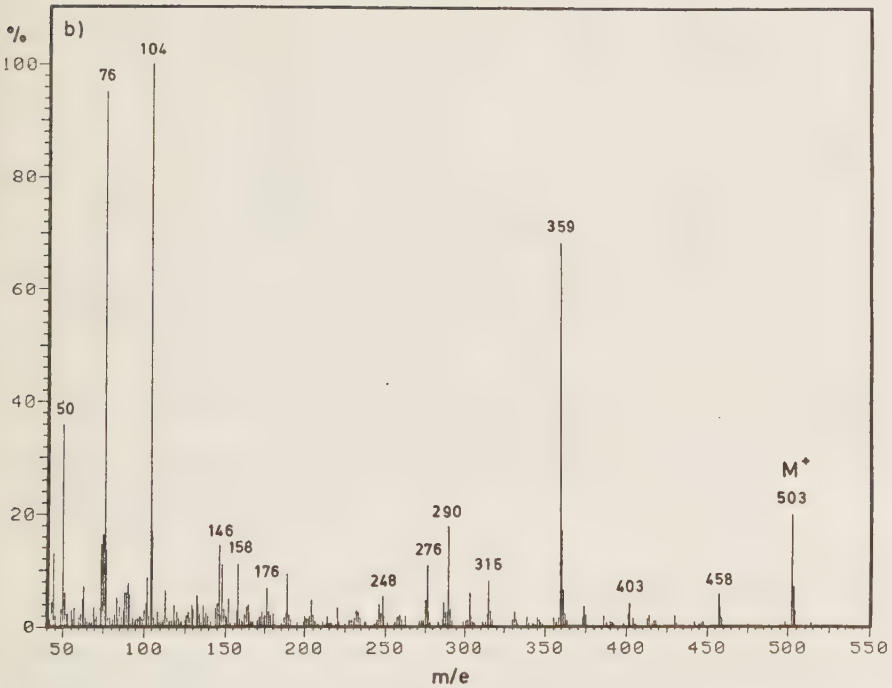


Abb. 20b : Massenspektrum des Gaitonde-Komplexes

Der nach 2.4.1.2 gereinigte Gaitonde-Komplex wurde fest a) oder nach Aufdampfen unter Stickstoff auf den Probenkopf b) in das Massenspektrometer gegeben und bei 70 eV gemessen.

Aus Abb. 21 geht hervor, daß die Fragmente 104 m/e, 359 m/e und 458 m/e zu dem Molekülion 503 m/e gehören müssen, da sie gleiche Ionenströme beim Aufheizen des Probenkopfes aufweisen.
Obwohl die vorliegenden Daten einen eindeutigen Strukturvorschlag noch nicht zulassen (siehe auch 3.3.1.6), kann nun der molare Extinktionskoeffizient bezüglich des Gaitonde-Komplexes ermittelt werden (3.3.1.4.2).

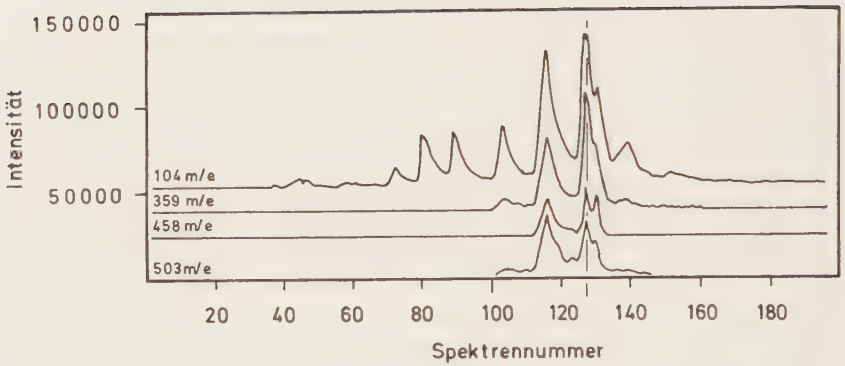


Abb. 21 : Vergleich der Ionenströme einzelner Massen beim Aufheizen

Es werden die Ionenströme der genannten Massenfragmente beim Aufheizen der Probe (flüssig) bis zu 350°C dargestellt. Die Spektrennummern des in Abb. 20 gezeigten Massenspektrums ist eingetragen.

3.3.1.4.2 Elementaranalyse

Die Elementatanalyse wurde von einem mit Laufmittel 1 - 3 (Tab.12) aufgereinigten Gaitonde-Komplex gewonnen, der bei Zimmertemperatur im Dunkeln mit Stickstoff zur Trockene eingedampft worden war. Trotz dieses schonenden Verfahrens trat eine leichte Braunfärbung auf, die auf eine geringe Komplexzerstörung schießen ließ. In der Annahme, daß keine flüchtigen Zerfallsprodukte entstanden sein können, wurde diese Probe trotzdem in der unter 2.3.7 beschriebenen Weise untersucht. Es wurden folgende Massenverhältnisse gemessen:

C 66,7 % ; H 4,31 % ; O 18,02 % ; N 3,84 % ; S 7,01 %

Damit ergibt sich bei einem Molekulargewicht von 503 (3.3.4.1.1) folgende Summenformel, wenn man S = 1 setzt:

$C_{25,23}\ H_{19,45}\ N_{1,23}\ S_{1,0}\ O_{5,14}$ gerundet : $C_{25}\ H_{19}\ N_1\ S_1\ O_5$

Es ergibt sich somit ein Molekulargewicht von 447. Die Differenz zwischen dem aus der Elementaranalyse errechneten und in der Massenspektrometrie gemessenen Molekulargewicht beträgt 56, was unter 3.3.1.5 diskutiert werden soll.

3.3.1.4.3 Spektrale Eigenschaften des Gaitonde-Komplexes

Zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ist die Kenntnis der spektralen Eigenschaften von Bedeutung. In Tab. 13 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Zuvor sei bemerkt, daß einige Spektren nicht über den gesamten Bereich gemessen werden konnten, da die Eigenabsorption der Lösungsmittel im UV-Bereich zu hoch war. Das Absorptionsspektrum der Gaitonde-Bande kann von 576 nm (Schwefelkohlenstoff) bis zu 557 nm (Aceton) schwanken. Der Komplex löst sich schlecht in n-Heptan und Petroläther.
Das Auftreten und die Breite der Schulter bei 530 nm ist stark lösungsmittelabhängig. Das Verhältnis der Maxima untereinander kann stark schwanken, wobei Chloroform den Gaitonde-Komplex am besten stabilisieren kann. Sein 560 nm/242 nm-Verhältnis liegt unter 1, wohingegen Alkohole hohe Werte aufweisen.
Dabei bildet sich eine große, breite Bande im UV-Bereich, die mit einer Zerstörung des Gaitonde-Komplexes einhergeht, da sich die Farbe von rot über braun bis schwarz ändern kann. Der molare Extinktionskoeffizient wird in Chloroform zu $\varepsilon_{560\ nm} = 1{,}653 \times 10^6\ cm^2 \times mol^{-1}$ und $\varepsilon_{546\ nm} = 0{,}959 \times 10^6\ cm^2 \times mol^{-1}$ ermittelt.

Tab. 13 : Absorptionsmaxima des Gaitonde-Komplexes in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	Absorptionsmaxima (nm)/Extinktion						Verhältnis
Methanol	556	0,294	348	0,462	231	2,048	1 / 1,57 / 6,96
Äthanol	558	0,265	347	0,462	213	3,261	1 / 1,44 / 12,38
n-Propanol	561	0,433	348	0,415	233	1,699	1 / 0,95 / 3,92
n-Butanol	562	0,654	348	0,343	210	3,438	1 / 0,52 / 5,24
i-Butanol	562	0,481	348	0,342	206	2,672	1 / 0,71 / 5,55
Aceton	557	0,787	345	0,467	n.b.	-	1 / 0,59 / -
Methylenchlorid	564	1,272	348	0,433	234	2,219	1 / 0,34 / 1,74
Chloroform	566	0,904	348	0,108	240	0,720	1 / 0,12 / 0,72
Tetrachlorkohlenstoff	565	1,173	348	0,353	260	0,979	1 / 0,30 / 0,83
Diäthyläther	558	0,537	346	0,332	218	1,747	1 / 0,62 / 3,25
Äthylacetat	558	0,987	346	0,394	248	1,313	1 / 0,39 / 1,33
Benzol	560	0,963	350	0,343	n.b.	-	1 / 0,35 / -
Toluol	568	0,938	350	0,354	n.b.	-	1 / 0,37 / -
n-Heptan	560	0,037	347	0,036	214	0,611	1 / 1,00 / 16,50
Petroläther Sdp. 40/65	559	0,105	346	0,061	225	0,309	1 / 0,58 / 2,94
Schwefelkohlenstoff	576	0,740	336	0,169	n.b.	-	1 / 0,22 / -

Es werden die Absorptionsmaxima des Gaitonde-Komplexes (2.4.1.2) angegeben, wobei der eingeengte Gaitonde-Komplex im jeweiligen Lösungsmittel aufgenommen wurde. Jedes Spektrum wurde gegen das entsprechende Lösungsmittel gemessen. Das Verhältnis der Absorptionsmaxima wird stets auf die Gaitonde-Bande bei 560 nm oder nahen Wellenlängen bezogen, deren Extinktion als 1 gesetzt wurde.
n.b. = nicht bestimmbar, da die Eigenextinktion des Lösungsmittels nicht kompensierbar war.

3.3.1.4.4 Stabilität des Gaitonde-Komplexes bei verschiedenen pH-Werten

Untersucht man die pH-Stabilität des Gaitonde-Komplexes, so kann man ab pH 3,0 eine deutliche Veränderung des Spektrums (Abb. 22) feststellen. Der Gaitonde-Peak bei 560 nm nimmt zugunsten der Bande bei 254 nm ab, um dann ab pH 4,0 einem Doppelpeak abnehmender Intensität zu weichen, der die Absorptionsmaxima von 591 nm und 545 nm besitzt. Außerdem verschwindet das Maximum bei 347 nm ab pH 5,0. Bei basischen pH-Werten kann nur noch die UV-Bande zwischen 254 - 263 nm beobachtet werden. Der Gaitonde-Komplex wird durch die Zugabe von Kalilauge (pH 14) irreversibel zerstört, da eine Rücktitration bis pH 0 mit Salzsäure nicht mehr das typische Spektrum ergibt (Ergebnisse nicht dargestellt).
Es sei schon jetzt darauf hingewiesen, daß bei pH 5,0 nicht das für den allgemeinen Ninhydrinnachweis charakteristische Spektrum des Cysteins (Abb. 3 und Abb. 4) auftritt.

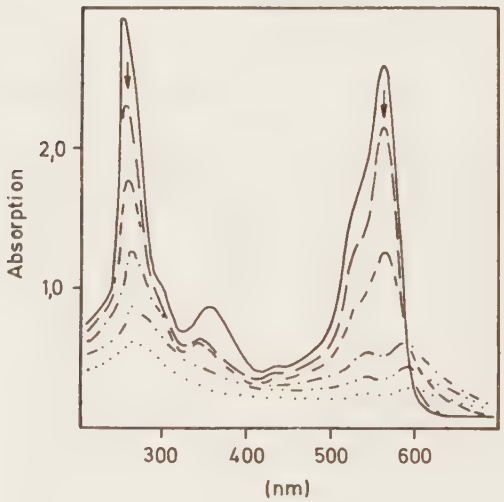


Abb. 22 : pH-Stabilität des Gaitonde-Komplexes

——— pH 0
— — — pH 1
- - - - pH 2
-.-.-.-. pH 3
-..-..- pH 4
..... pH 5

Der nach 2.4.1.2 gewonnene Gaitonde-Komplex wurde in 3 ml Eisessig/Salzsäure (4/1) aufgenommen und sein Spektrum aufgezeichnet (pH 0). Durch die jeweilige Zugabe von ca. 1 ml 6 N Kalilauge wird der pH-Wert um eine Stufe auf 3,0 ; 4,0 usw. angehoben und jeweils ein Spektrum gegen das obige Säuregemisch gemessen.

3.3.1.5 Versuche zum Reaktionsmechanismus

3.3.1.5.1 Abspaltung von Kohlendioxid

Da über die Bildung des Gaitonde-Komplexes keinerlei Hinweise vorlagen, sollte in einem ersten Versuch geklärt werden, ob bei der Reaktion die Carboxylgruppe des Cysteins als Kohlendioxid freigesetzt wird. Dazu läßt man 1 µmol L-Cystein mit dem Standardtest 2.2.3.2 reagieren, wobei man das Reagenzglas mit einer Gummikappe verschloß. Der Gasraum wurde ständig mit Stickstoff gespült, der anschließend durch eine gesättigte Barytlauge perlte. Nach Reaktionsende wurde die Trübung des gebildeten Bariumcarbonates gegen einen Nullwert, der kein Ninhydrin enthielt am Photometer gemessen. Da die Trübung kein Absorptionsmaximum aufweist, kann nur das Spektrum von 350 - 750 nm beobachtet werden.Auch ohne Ninhydrin wird Kohlendioxid freigesetzt, wenngleich in Gegenwart von Ninhydrin wesentlich mehr Kohlendioxid entwickelt wird. Eine Quantifizierung des gebildeten Bariumcarbonates ist mit der verwendeten Methode nicht möglich.

3.3.1.5.2 Abspaltung von Schwefelwasserstoff

Um den Reaktionsweg des Schwefelatoms verfolgen zu können, setzte man (^{35}S)-L-Cystein ein, ließ es im Standardtest 2.2.3.2 reagieren und bestimmte die Verteilung der Reaktionsprodukte nach der üblichen Extraktion mit Diäthyläther 2.4.1.1 .Zudem trieb man die Reaktionsgase in einem Stickstoffstrom aus und perlte sie durch eine Zinkacetatlösung, um Schwefelwasserstoff abfangen zu können.

Tab. 14 : Einbau von (^{35}S)-Atomen in den Gaitonde-Komplex

	Ansatz ohne Ninhydrin		Ansatz mit Ninhydrin	
	ipm	%	ipm	%
Reaktionsansatz vor Inkubation	$26{,}9 \times 10^6$	-	$26{,}5 \times 10^6$	-
Reaktionsansatz nach Inkubation	$27{,}3 \times 10^6$	100,0 %	$27{,}1 \times 10^6$	100,0 %
Diäthylätherphase	572650	2,1 %	$19{,}6 \times 10^6$	72,2 %
Wasserphase	$22{,}0 \times 10^6$	81,0 %	$2{,}8 \times 10^6$	10,5 %
Zinkacetatfalle	27300	0,1 %	299819	1,1 %

1 µmol (^{35}S)-L-Cystein (79 µCi/µmol = 3 G Bq/µmol), gelöst in 1 ml Wasser und 1 ml Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2), wurden 10 Minuten bei 100°C erhitzt. Es wurde ein Aliquot zur Radioaktivitätsbestimmung vor und nach dem Erhitzen (2.2.9) entnommen. Nach Zugabe von insgesamt 3 ml Diäthyläther konnte der Gaitonde-Komplex extrahiert werden. Auch von der Wasserphase und der Diäthylätherphase wurde die Radioaktivität bestimmt. Die Reaktionsgase wurden mit Stickstoff in eine gesättigte Zinkacetatlösung ausgetrieben. Der kaum sichtbare Niederschlag wurde aufgeschüttelt und seine Radioaktivität bestimmt.

In Tab. 14 ist die Verteilung der Reaktionsprodukte von Cystein mit Ninhydrin unter sauren Bedingungen aufgezeigt, wobei die Ergebnisse mit einem Test ohne Ninhydrin unter identischen Bedingungen verglichen werden.
Die Hauptmenge der (^{35}S)-markierten Thiolgruppe des Cysteins scheint in den Gaitonde-Komplex eingebaut worden zu sein, da kein (^{35}S)-markierter Schwefelwasserstoff in der Zinkacetatlösung ausgefällt werden kann. Da auch beim Erhitzen kein Markierungsverlust beobachtet wurde, wird obige Annahme gestützt. Die Restaktivitäten in der Wasserphase können auf Restmengen von (^{35}S)-L-Cystein oder hydrophile Reaktionsprodukte zurüchzuführen sein. Die Kontrolle ohne Ninhydrin zeigt deutlich, daß fast keine Markierung in der organischen Phase gefunden werden kann.
Die Markierung des Gaitonde-Komplexes wird noch durch die Trennung mittels Dünnschichtchromatographie im Laufmittel 1 (2.3.1) untermauert, wobei die Diäthylätherphase 2 Produkte enthält, da neben der Gaitonde-Bande (R_f = 0,85) noch eine Bande am Start beobachtet wird (Abb. 23).
Eine Quantifizierung der Anzahl der eingebauten Schwefelatome/Molekül im Gaitonde-Komplex ist nicht möglich, da das eingesetzte (^{35}S)-L-Cystein auch Verunreinigungen von Cysteinsäure und Cysteinsulfinsäure enthielt.

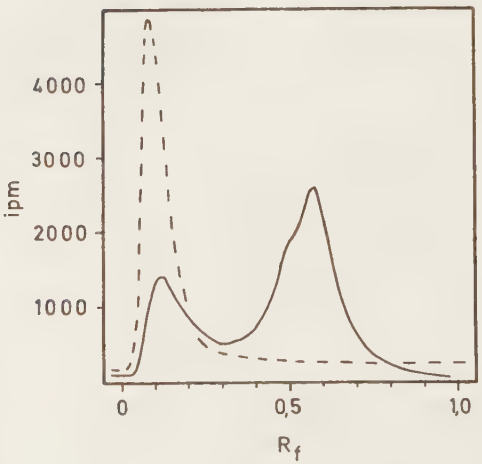


Abb. 23 :

Dünnschichtchromatographische Auftrennung des (^{35}S)-markierten Gaitonde-Komplexes

——— Ansatz mit Ninhydrin
- - - - Ansatz ohne Ninhydrin

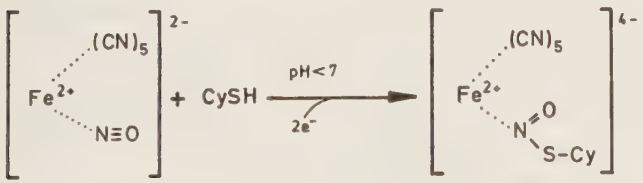
Die nach Tab. 14 erhaltene (^{35}S)-haltige Diäthyläther-Fraktion wurde einer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel GF_{254} (0,25 mm) mit dem Laufmittel Chloroform/Aceton (9/1) unterzogen (2.3.1). Die Radioaktivität ermittelte man in der unter 2.3.1 beschriebenen Weise. Die Messung mit dem Dünnschichtscanner fand bei 1650 V, der Empfindlichkeit von 100 mV und der Trägheit von 10 statt.

3.3.1.6 Diskussion und Strukturvorschlag

Bei den Versuchen zur Regulation der Cysteinsynthase (3.4) und deren Aufreinigung (3.7) war es nötig, einen möglichst spezifischen Cysteinnachweis einzusetzen. Aus der Literatur z.B. KACAK und VEJDELEK (1974, 1977, 1983), sind eine Vielzahl von chemischen Nachweismethoden bekannt, von denen an dieser Stelle nur die wichtigsten fünf besprochen werden sollen. Dabei versuchte man immer, gefärbte Reaktionsprodukte zu erhalten, was meist mehrere Versuchsschritte notwendig macht.
Es sind dies folgende Verfahren:

a) Nachweis mit Nitroprussid-Natrium

Cystein reagiert im alkalischen Medium mit Nitroprussid-Natrium zu einem Thiol-Nitroprussid-Komplex, der ein Absorptionsmaximum, je nach Methode, zwischen 520 - 540 nm besitzt. Durch Ansäuern entsteht ein stabiler roter Komplex mit einem λ_{max} von 590 - 700 nm (VACHEK 1960) (39).



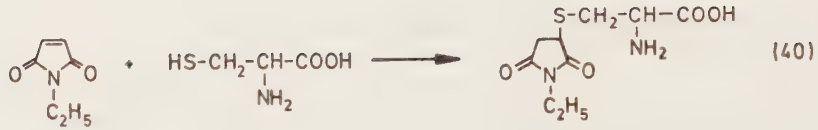
(39)

Nitroprussid Nitroprussid-Cystein

Diese Methode ist nicht für Cystein spezifisch, da sowohl Thiole, S-Acetylthiole wie auch Thioäther den gleichen Farbkomplex ergeben (KACAC und VEJDELEK 1974, 1977,1983).

b) Derivatisierung mit N-Äthylmaleinimid (NEM)

Die Thiolgruppe des Cysteins addiert sich unter neutralen Bedingungen an die olefine Doppelbindung des N-Äthylmaleinimids (NEM), wobei die Extinktion des NEM (λ_{max} = 302 nm) abnimmt, und das S-(N-Äthylsuccinimido)-L-Cystein entsteht (SMYTHE et al. 1960) (40). Meist schließt sich eine papier- (BECKER et al. 1969) oder dünnschichtchromatographische Auftrennung (NG und ANDERSON 1979) des NEM-Adduktes an.



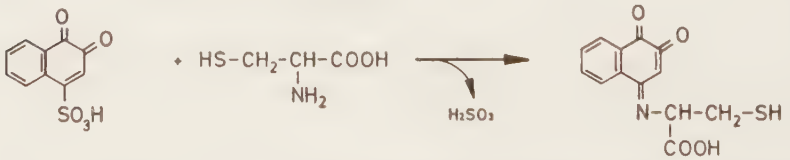
(40)

N-Äthyl-maleinimid | Cystein | S-(N-Äthylsuccinimido)-Cystein

Diese Reaktion erfolgt auch mit allen Thiolen, S-Acylthiolen und Thiosulfinaten (KACAK und VEJDELEK 1974, 1977, 1983) sowie mit Schwefelwasserstoff, Thiosulfat und Sulfit (ELLIS 1966). Die Methode ist daher weniger zum spezifischen Cysteinnachweis als zur Trennung der NEM-Addukte des Cysteins, Homocysteins und Glutathion geeignet, die in der Dünnschichtchromatographie sonst nur sehr verwaschene Flecke ergeben.

c) Umsatz mit 1,2-Naphtochinon-4-sulfonat

Dieses Verfahren ist schon seit langem als "Sullivan-Verfahren" bekannt. Im Gegensatz zu den anderen Methoden, reagiert hier unter alkalischen Bedingungen die Aminogruppe des Cysteins mit 1,2-Naphtochinon-4-sulfonat, wobei unter Freisetzung von Sulfat, das rotgelbe Kondensationsprodukt 1,2-Naphtochinon-4-Cystein entsteht, welches ein λ_{max} von 520 - 540 nm aufweist (KACAK und VEJDELEK 1974, 1977, 1983) (41). Die Teilnahme einiger Radikalreaktionen wird diskutiert. Das überschüssige Reagenz wird mit dem Thiosulfat oder Ascorbat zum farblosen Dihydroxyderivat reduziert. Der Komplex kann durch Ansäuren stabilisiert werden und hat ein λ_{max} von 420 - 480 nm.



(41)

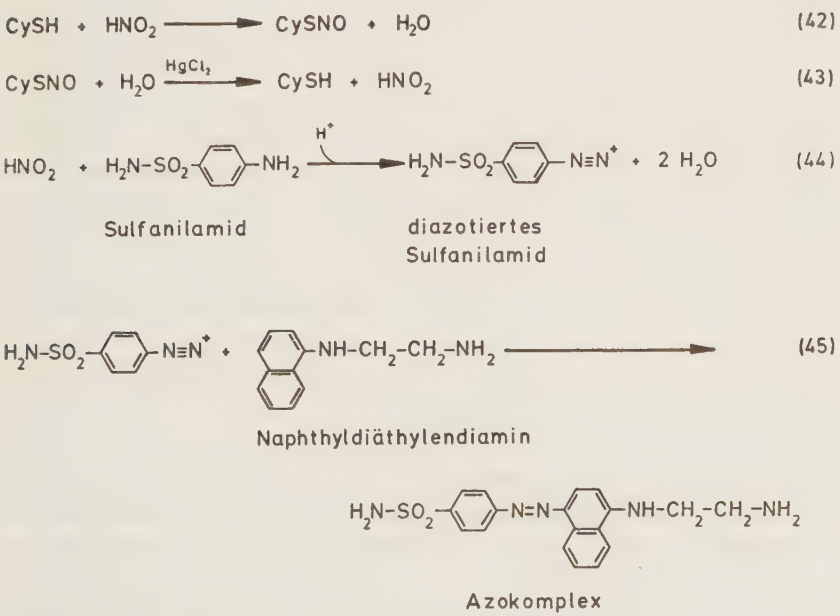
1,2-Naphtochinon-4-sulfonat | Cystein | 1,2-Naphtochinon-4-Cystein

Das Verfahren weist allgemein primäre und sekundäre Amine und Aminosäuren nach (KACAK und VEJDELEK 1974, 1977, 1983). Die von SULLIVAN und HESS (1936) modifizierte Methode soll nur mit Aminosäuren reagieren, die eine freie Thiol-, Amino- und Carboxylgruppe , wie Homocystein und Cystein, tragen.
Obwohl das Verfahren somit spezifisch zu sein scheint und zudem eine Nachweisgrenze im Mikromaßstab von 20 nmol/ml erreicht (MATSUURA und SZAFARZ 1965), ist es für den Routinebetrieb wenig geeignet, da die Reaktionszeiten wegen der

labilen Komplexe genau einzuhalten und zudem mehrere Arbeitsschritte notwendig sind.

d) Reaktion mit salpetriger Säure

Dieses Verfahren wird neben dem in dieser Arbeit verwendeten Nachweis (e) am häufigsten eingesetzt und geht auf LIDDELL und SAVILLE (1959) zurück. Cystein reagiert unter neutralen Bedingungen mit salpetriger Säure zu einem Nitroso-Cystein (42). Das überschüssige Nitrit wird durch nachfolgende Zugabe von Ammoniumsulfamat ($NH_4SO_3NH_2$) zerstört. Quecksilberchlorid setzt anschließend das Nitrit wieder frei (43), das im bekannten Nachweisverfahren Sulfanilamid diazotiert (44), um dann mit N-1-Naphthyläthylendiamin einen Azofarbstoff (λ_{max} = 540 nm) zu bilden (KREDICH und BECKER 1971) (45). Dieser ist aber nur 15 Minuten stabil. Die Nachweisgrenze liegt bei 20 nmol.



Das Verfahren ist nicht für Cystein spezifisch, da alle Thiole in analoger Weise reagieren. Cystin ergibt keinen Azokomplex (LIDDELL und SAVILLE 1959). Der Test wird nicht durch Trispuffer gehemmt, wohingegen 5 mM Schwefelwasserstoff, die Konzentration des Cysteinsynthasetestes (2.5.1), den Cysteinnachweis

zu 100% unterbinden (KREDICH und TOMKIN 1966). Daher ist auch diese Methode für unsere Fragestellung nicht geeignet.

e) Nachweis mit dem sauren Ninhydrinreagenz (Gaitonde-Reagenz)

Im Vergleich zu den bisher genannten Nachweisen ist das in dieser Arbeit verwendete Verfahren für Cystein und Cystinderivate bei niedriger Nachweisgrenze (10 nmol) spezifisch und zudem für den Routineeinsatz gut geeignet, da die Reaktionszeiten nicht exakt eingehalten werden müssen und das Reaktionsprodukt stabil ist.

Diese Methode wurde von CHINARD (1952) zum ersten Mal für den Nachweis von einigen Aminosäuren, so auch Cystein, entwickelt. Sein saures Ninhydrinreagenz 2 bestand aus einem Eisessig/Phosphorsäuregemisch und war weniger spezifisch als das hier vorgestellte Verfahren, wobei sich der pH zwischen 0,3 und 1,0 gegenüber pH 0 bewegte. WORK (1957) veränderte die Stärke der Phosphorsäure, was zu einer Verschiebung der Spezifität führte. GAITONDE (1967) erkannte als Erster nach Austausch der Phosphorsäure durch Salzsäure die Vorteile dieses "Gaitonde-Reagenzes" für den spezifischen Cysteinnachweis. Dabei entstand der typische rote Farbkomplex (λ_{max} = 560 nm), der seitdem oft zur Bestimmung der Cysteinsynthese eingesetzt und als Gaitonde-Komplex bezeichnet wird, obwohl es sich im chemischen Sinne nicht um einen Komplex handeln dürfte. Bei den in diesem Kapitel genannten Kation-Cystein-Komplexen handelt es sich dagegen um wirkliche Komplexe.

Zu Anfang dieser Arbeit wurden die Reaktionsbedingungen optimiert. Reaktionszeit und -temperatur weichen nur wenig von den bekannten Bedingungen ab (GUNDLACH et al. 1974). Die Wahl von 10 Minuten bei 95°C geschah besonders in Hinblick auf eine hohe Probenzahl, so daß die Zeitverzögerung beim Aufarbeiten der Proben nicht so zum Tragen kam.

Die Stabilisierung des roten Reaktionskomplexes wurde bisher mit 2 - 10 ml Äthanol erreicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen (Tab. 5), daß n-Butanol die Zerstörung des Komplexes um den Faktor 10 verringert und zudem eine Volumenreduzierung möglich ist, was zu Kosteneinsparungen und geringeren Lösungsmittelabfällen führt.

Die Originalzusammensetzung des "Gaitonde-Reagenzes" (Eisessig/Salzsäure 6/4; 250mg Ninhydrin/10ml) wurde nach HENSEL und TRÜPER (1981) auf 4/1 und 125 mg Ninhydrin/10 ml verändert. Aus Abb. 12 geht hervor, daß dieses Säureverhältnis eine Produktsteigerung bewirkt.

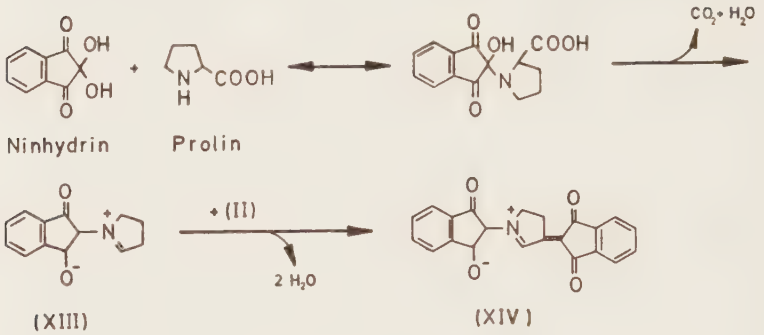
Es sei noch an dieser Stelle erwähnt, daß des öfteren, besonders bei hohen Cysteinmengen, aber nicht stets reproduzierbar, die Extinktion bei 560 nm abnahm und ein neues Maximum bei 611 nm auftrat, wie dies auch GAITONDE (1967) für ein Reagenz, das nur Salzsäure enthielt, beschrieben hat. Zudem kann die Ninhydrinmenge auf die Hälfte (125 mg/10 ml) reduziert werden, ohne die Komplexmenge zu reduzieren. Für die Reaktion ist zudem ein hohes Verhältnis von Ninhydrin zu Cystein (3.3.1.4.4) von mindestens 65/1 notwendig, was auch für den normalen Ninhydrinnachweis bei pH 5,0 (3.1.1)von MEYER (1957) für Alanin (250/1) beobachtet wurde.

Die Spezifität des Gaitondereagenzes ist ein Schwerpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit. Bisher wurde das Nachweisverfahren meist als einzige Methode zur Bestimmung von enzymatisch oder in vivo gebildetem Cystein angewandt, ohne das Ergebnis durch Dünnschichtchromatographie oder -elektrophorese abzusichern. Wie aber die Arbeiten von CHINARD (1952) und WORK (1957) zeigten, können auch Djenkolsäure, Diaminopimelinsäure und S-ß-Aminoäthylcystein,sowie Prolin mit dem Orginalreagenz von CHINARD (1952) nachgewiesen werden. Dabei beobachtet man wohl anders gefärbte Reaktionsprodukte, die meist ein λ_{max} bei 360 nm und 450 nm aufweisen. Inkubationszeit (5 Minuten oder 60 Minuten) sowie pH-Wert des Reagenzes üben dabei einen starken Einfluß auf die Bildung der chromophoren Komplexe aus, wie dies WORK (1957) für Diaminopimelinsäure, Djenkolsäure und Lanthionin zeigen konnte. Erst GAITONDE (1967) verbesserte durch den Austausch von Phosphorsäure gegen Salzsäure die Spezifität, so daß er nur Cystein als roten Farbkomplex (λ_{max} = 560 nm) nachweisen konnte. Wie die eigenen Versuche zeigen (Tab. 6), bilden erheblich mehr Substanzen mit Ninhydrin unter sauren Bedingungen gefärbte Produkte.

Zuerst sollen die andersfarbigen Komplexe (Tab. 6 ; Abb. 14 a,b,c) abgehandelt werden. Dabei ist besonders Cystin mit einem spezifischen Spektrum (561 nm, 506 nm, 455 nm ; Abb. 14a) zu nennen (GAITONDE 1967). Obwohl Cystin allein schon eine geringe Cysteinmenge bei 560 nm vortäuscht, führt der Zusatz von DTE bei den meisten Enzymtesten zu noch erheblich höheren Fehlern, da Cystin zu Cystein reduziert wird, welches eine höhere Extinktion ergibt. Auch Cystathionin zeigt bei 560 nm eine geringe Absorption (Abb. 14 a ; KASHIWAMATA und GREENBERG 1970).

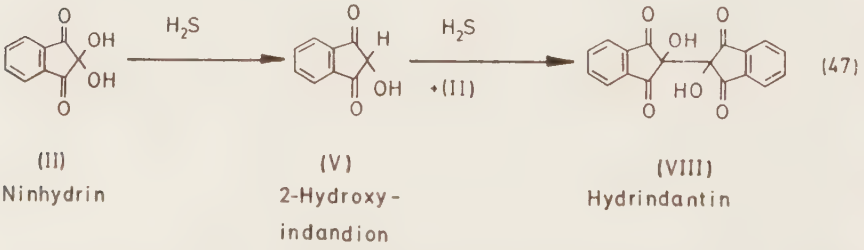
Prolin zeigt unter sauren Bedingungen ein typisches Spektrum (λ_{max} = 515 nm) (GAITONDE 1967), für das schon ein Strukturvorschlag von McCALDIN (1960) vorliegt. Dabei reagiert Ninhydrin mit Prolin zu einem Addukt, das unter Decarboxylierung ein gelbes Produkt ergibt (XIII). Nur unter neutralen Bedingungen kann ein weiteres Molekül Ninhydrin addiert werden, um eine rotviolette

Substanz (XIV) zu ergeben (KACAK und VEJDELEK 1974) (46).



(46)

Von besonderer Bedeutung ist die Beobachtung, daß Schwefelwasserstoff mit dem Gaitonde-Reagenz zu einer gelben Substanz reagiert (Abb. 14b), wobei es sich um Hydrindantin handeln könnte. Nach McCALDIN (1960) kommt es in Gegenwart von Schwefelwasserstoff zur Reduktion von Ninhydrin zu 2-Hydroxyindandion, welches mit einem weiteren Molekül Ninhydrin und Schwefelwasserstoff zu Hydrindantin reduziert wird (SCHÖNBERG und MOUBASHER 1949, RUHEMANN 1911) (47).



(47)

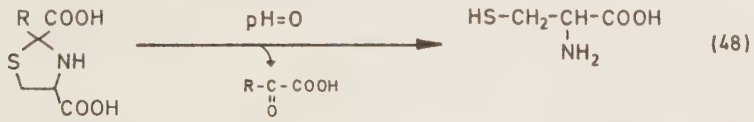
Es war daher nötig, bei allen Enzymversuchen, die Schwefelwasserstoff enthielten (2.5.1), einen Nullwert ohne O-Acetylserin zu messen, um diesen vom Enzymwert abziehen zu können.

Auch Sulfocystein und Sulfothiocystein können einen roten Gaitonde-Komplex (λ_{max} = 560 nm) ergeben, wie dies HENSEL und TRÜPER (1976) und UBUKA et al. (1980 a) zeigten. Die Methode ist auch für Selenocystein geeignet (NG und ANDERSON 1978 b). Aufgrund dieser Befunde erschien es notwendig, eine Vielzahl von Cystein- und Cysteinhomologen-Derivaten mit dem sauren Ninhydrinreagenz zu testen. Alle in Tab. 6a genannten Verbindungen sind Derivate des Cysteins.

Zudem sind noch die in vivo gebildeten Gaitonde-positiven Substanzen (3.6) zu nennen. Schema B faßt das Verhalten dieser Verbindungen mit dem Gaitonde-Reagenz zusammen.

Auffallend ist, daß nur Cysteinderivate einen Gaitonde-Komplex bilden. Es galt daher zu klären, ob sie selbst in einer unspezifischen Reaktion mit Ninhydrin unter sauren Bedingungen reagieren oder ob sie durch das Gaitonde-Reagenz zu Cystein hydrolisiert werden, welches spezifisch mit Ninhydrin reagiert. Aus Tab. 7 geht hervor, daß letzterer Fall zutrifft. Das Entstehen von Cystein wurde durch Säulentrennung, Dünnschichtelektrophorese und Cysteindesulfhydrasen nachgewiesen. Es trat nur eine geringe Racemisierung auf. Zudem bildete sich ein anderes Hydrolyseprodukt, dessen Natur bisher nicht bekannt ist. Die relativ labilen Cysteinester werden zu Cystein oder einer Thiolgruppen-haltigen Verbindung (Fr.46) gespalten, da diese mit DTNB (2.2.4) positive Ergebnisse lieferte. Für die spezifische Reaktion von Ninhydrin mit Cystein scheint eine freie Thiol-, Amino- und Carboxylgruppe notwendig zu sein. Zudem ist die Reaktion für einen C_3-Körper spezifisch, da C_4-Körper, wie Homocystein, nicht reagieren.

Auch die in Tab. 6 genannten Verbindungen, deren Hydrolyse nicht untersucht worden ist, dürften in gleicher Weise zu Cystein gespalten werden. In Analogie zu Sulfocystein, dessen Hydrolyse schon SEGEL und JOHNSON (1963) nachwiesen, werden Sulfothiocystein ($CySSSO_3$) und Thiocystein (CySSH) zu Cystein reagieren. Aus Gleichung (48) geht hervor, daß Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure und 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure zu Cystein hydrolisiert werden können.



R = H Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure Cystein

R = CH_3 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure

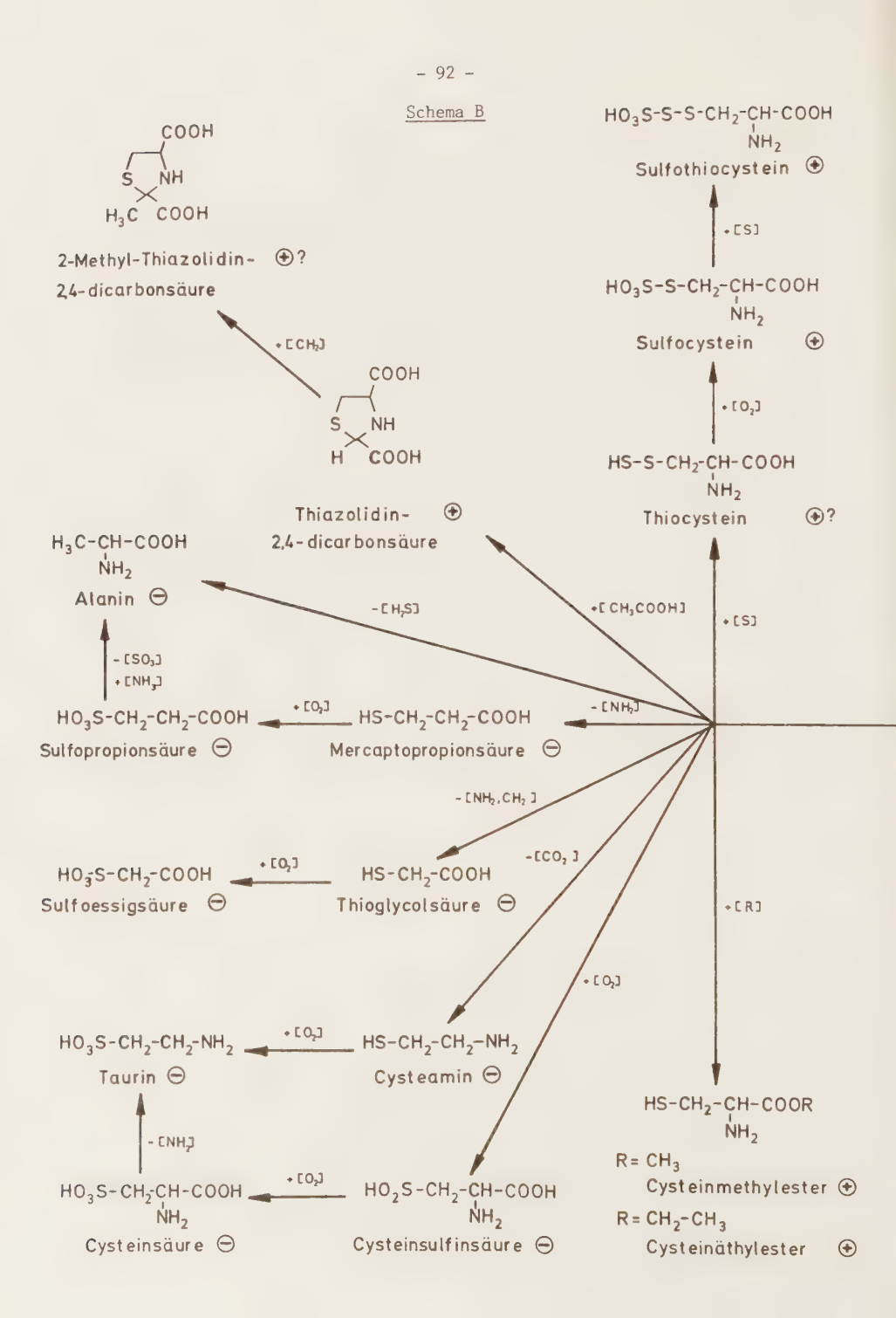
Schema B : Spezifität des Gaitonde-Reagenzes (s. nächste Seite)

⊕ = typisches Spektrum ⊛ = atypisches Spektrum

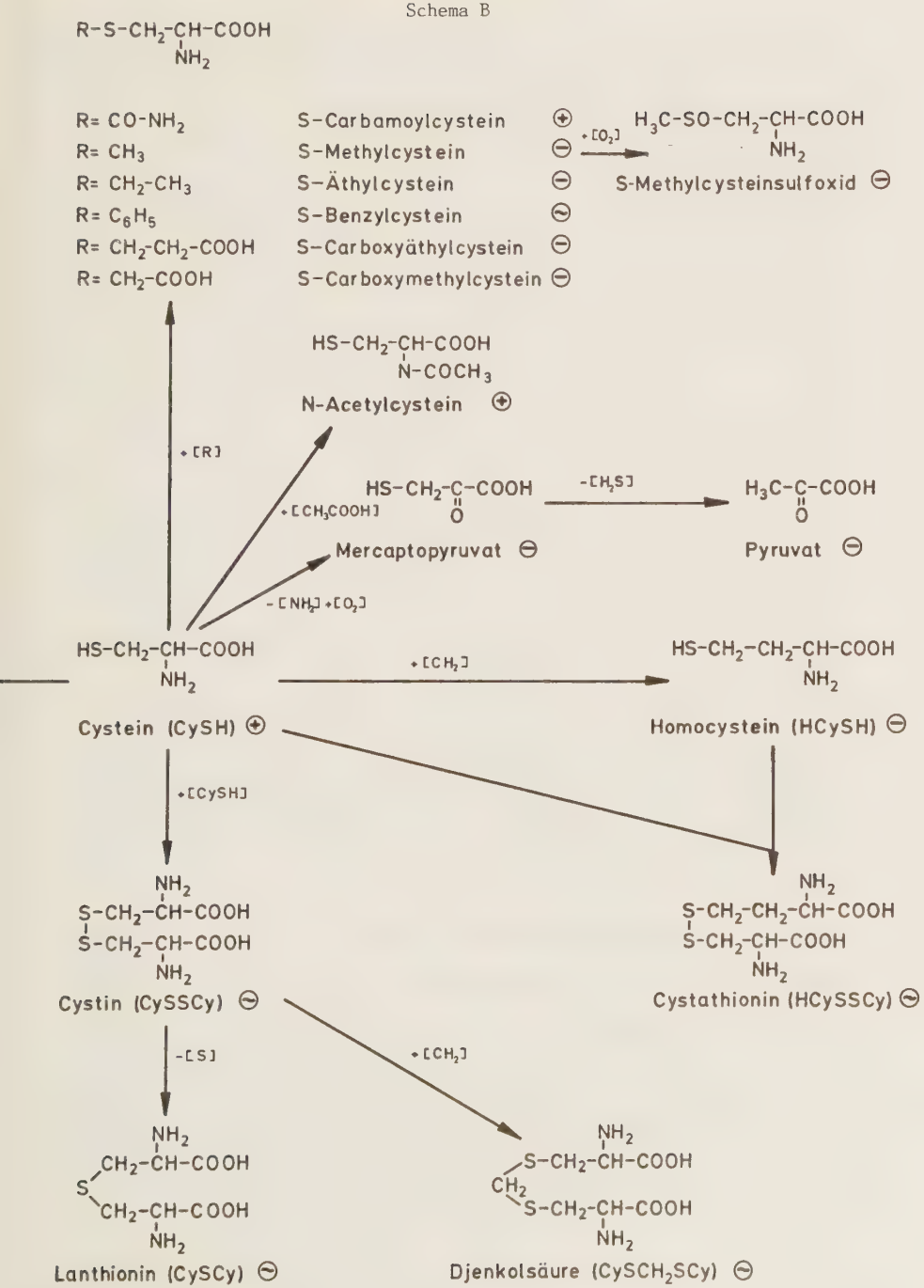
⊖ = kein Spektrum

Es werden die Gruppen über den Reaktionspfeilen angegeben, die in der neuen Verbindung hinzugekommen oder weggenommen sind. Der Übersichtlichkeit wegen handelt es sich dabei um keine chemischen Reaktionsgleichungen.

Schema B


COOH
S NH
H3C COOH
2-Methyl-Thiazolidin- ⊕?
2,4-dicarbonsäure
+[CH2]
COOH
S NH
H COOH
Thiazolidin- ⊕
2,4-dicarbonsäure
HO3S-S-S-CH2-CH-COOH
NH2
Sulfothiocystein ⊕
+[S]
HO3S-S-CH2-CH-COOH
NH2
Sulfocystein ⊕
+[O2]
HS-S-CH2-CH-COOH
NH2
Thiocystein ⊕?
H3C-CH-COOH
NH2
Alanin ⊖
-[H2S]
+[CH3COOH]
+[S]
-[SO3]
+[NH3]
HO3S-CH2-CH2-COOH
Sulfopropionsäure ⊖
+[O2]
HS-CH2-CH2-COOH
Mercaptopropionsäure ⊖
-[NH3]
-[NH2.CH2]
HO3S-CH2-COOH
Sulfoessigsäure ⊖
+[O2]
HS-CH2-COOH
Thioglycolsäure ⊖
-[CO2]
+[R]
+[O2]
HO3S-CH2-CH2-NH2
Taurin ⊖
+[O2]
HS-CH2-CH2-NH2
Cysteamin ⊖
HS-CH2-CH-COOR
NH2
R= CH3
Cysteinmethylester ⊕
R= CH2-CH3
Cysteinäthylester ⊕
-[NH3]
HO3S-CH2-CH-COOH
NH2
Cysteinsäure ⊖
+[O2]
HO2S-CH2-CH-COOH
NH2
Cysteinsulfinsäure ⊖

Schema B


R-S-CH2-CH-COOH
NH2
R= CO-NH2 S-Carbamoylcystein ⊕
R= CH3 S-Methylcystein ⊖
R= CH2-CH3 S-Äthylcystein ⊖
R= C6H5 S-Benzylcystein ⊖
R= CH2-CH2-COOH S-Carboxyäthylcystein ⊖
R= CH2-COOH S-Carboxymethylcystein ⊖
+[O2]
H3C-SO-CH2-CH-COOH
NH2
S-Methylcysteinsulfoxid ⊖
HS-CH2-CH-COOH
N-COCH3
N-Acetylcystein ⊕
+[R]
+[CH3COOH]
HS-CH2-C-COOH
O
-[H2S]
H3C-C-COOH
O
Mercaptopyruvat ⊖
Pyruvat ⊖
-[NH2]+[O2]
HS-CH2-CH-COOH
NH2
+[CH2]
HS-CH2-CH2-CH-COOH
NH2
Cystein (CySH) ⊕
Homocystein (HCySH) ⊖
+[CySH]
NH2
S-CH2-CH-COOH
S-CH2-CH-COOH
NH2
Cystin (CySSCy) ⊖
NH2
S-CH2-CH2-CH-COOH
S-CH2-CH-COOH
NH2
Cystathionin (HCySSCy) ⊖
-[S]
+[CH2]
NH2
CH2-CH-COOH
S
CH2-CH-COOH
NH2
Lanthionin (CySCy) ⊖
NH2
S-CH2-CH-COOH
CH2
S-CH2-CH-COOH
NH2
Djenkolsäure (CySCH2SCy) ⊖

Die in dieser Arbeit angewandte Methode kann bis zu 10 nmol Cystein nachweisen, was eine Verbesserung gegenüber dem von GAITONDE (1967) beschriebenen Verfahren (bis 50 nmol) bedeutet. Die Nachweisgrenze kann sogar bis zu 2 nmol verringert werden, wenn eine Verdünnung mit 2 ml n-Butanol unterbleibt, was aber eine schnelle Probenaufarbeitung erfordert.

Betrachtet man den Einfluß von Kationen auf die Komplexbildung (Tab.9), so scheinen Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+},und Co^{2+} diese zu stören. Dafür bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten an. Entweder gehen die Kationen einen Komplex mit dem sauren Cystein-Ninhydrin-Reaktionsprodukt (Gaitonde-Komplex) ein, wobei das Absorptionsspektrum verändert wird, oder Cystein reagiert direkt mit den Kationen, so daß die Bildung des roten Gaitonde-Komplexes unterbleibt. Um dies zu klären, wurde der nach 2.4.1.2 gereinigte Gaitonde-Komplex zur Trockene eingeengt und in Eisessig/Salzsäure (4/1) gelöst. Nach Spektralanalyse gegen das Säuregemisch gab man 2 µmol einer Cu^{2+}- oder Fe^{2+}-bzw. Fe^{3+}-Lösung hinzu und nahm ein neues Spektrum auf. Dabei wurde keine deutliche Extinktionsabnahme des typischen Gaitonde-Komplexes im Bereich 500 - 600 nm sowie keine Spektralverschiebung beobachtet (Ergebnisse nicht näher dargestellt). Somit kann eine echte Komplexbildung von Kupfer oder Eisen mit dem Gaitonde-Komplex ausgeschlossen werden. Gegen diese Hypothese spricht auch die Tatsache, daß Kobalt-(II)-Ionen den Cysteinnachweis erheblich weniger als Cu^{2+}- oder Fe^{2+}- bzw. Fe^{3+}-Ionen stören, obwohl Co^{2+}-Ionen ein besserer Komplexbildner sind.

Somit müssen Cu^{2+}-, Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen schon vor Zugabe des Gaitonde-Reagenzes mit Cystein reagiert haben. Betrachtet man die vorliegende Literatur zur Komplexbildung und Oxidation durch diese Ionen, wie sie JOCELYN (1972) zusammengefaßt hat, so laufen die meisten der beschriebenen Reaktionen nur unter extrem basischen Bedingungen ab. Für unsere pH-Verhältnisse (pH 7,5) liegen nur wenige Ergebnisse vor.

$$2\ Cu^{2+} + 2\ CySH \rightleftharpoons 2\ CyS\text{-}Cu^{2+} + 2\ H^{+} \qquad (49)$$

$$2\ CyS\text{-}Cu^{2+} \longrightarrow 2\ Cu^{+} + 2\ CyS^{\cdot} \qquad (50)$$

$$2\ CyS^{\cdot} \longrightarrow CySSCy \qquad (51)$$

$$2\ Cu^{+} + 1/2\ O_2 + 2H^{+} \longrightarrow 2\ Cu^{2+} + H_2O \qquad (52)$$

$$2\ CySH + 1/2\ O_2 \longrightarrow CySSCy + H_2O \qquad (53)$$

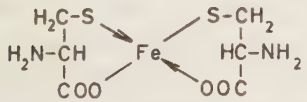
Kupfer-(II)-Ionen stören den Cysteinnachweis vollständig (Tab. 9 ; Abb. 16). Sie scheinen die Oxidation von Cystein zu Cystin zu katalysieren (53) (HANAKI und KAMIDE 1975, KOBASHI 1968). Dabei bildet sich rasch (10 msec) ein roter Cu^{2+}-Cysteinkomplex (49), der sodann zu Cu^{1+}-Ionen und Cysteinradikalen reduziert wird (50). Cystin entsteht durch Reaktion von zwei Cysteinradikalen (51). Das Cu^{1+}-Ion wird mit Sauerstoff unter Wasserbildung zu Cu^{2+}-Ionen oxidiert (52) und regeneriert. Da bei Zugabe des Gaitonde-Reagenzes kein Cystein mehr vorliegt, tritt auch kein Gaitonde-Komplex auf.

$$2\ Fe^{2+} + 4\ CySH \longrightarrow 2\ Fe(CyS)_2 + 4\ H^+ \qquad (54)$$

$$2\ Fe(CyS)_2 + O_2 + 2\ H^+ \longrightarrow 2\ FeOH(CyS)_2 \qquad (55)$$

$$2\ FeOH(CyS)_2 \longrightarrow CySSCy + Fe(CyS)_2 + Fe(OH)_2 \qquad (56)$$

Eisen-(II)-Ionen können in analoger Weise reagieren, wobei zuerst ein Fe^{2+}-Cysteinkomplex (XV) entsteht (54), der mit Sauerstoff zum tief orange-roten Fe^{3+}-Cysteinkomplex oxidiert (55). Da dieser nicht sehr stabil ist, bildet sich Cystin und der anfängliche Fe^{2+}-Cysteinkomplex (XV) durch Autoxidation (56). Das Eisenhydroxid fällt aus und muß vor der Spektralanalyse durch Zentrifugieren abgetrennt werden (SCHUBERT 1932). Diese Reaktionen sind sehr pH-abhängig, wobei die Ionisation der Thiolgruppe von besonderer Bedeutung ist, da Eisenionen stärker an die $R\text{-}S^-$- als an die $R\text{-}COO^-$-Gruppe bindet. Fe^{3+}-Ionen bilden sofort den Fe^{3+}-Cysteinkomplex, um dann den gleichen Katalysatorkreislauf wie Fe^{2+} zu durchlaufen. Es steht somit kein Cystein zur Gaitonde-Komplexbildung zur Verfügung.



(XV)

$$2\ Co^{2+} + 4\ CySH \longrightarrow 2\ Co(CyS)_2 + 4\ H^+ \qquad (57)$$

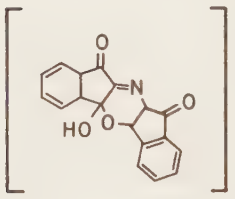
$$2\ Co(CyS)_2 + O_2 + 2\ H^+ \longrightarrow 2\ CoOH(CyS)_2 \qquad (58)$$

Kobalt-(II)-Ionen dagegen reduzieren nur den Cysteinnachweis, können ihn aber nicht vollständig unterbinden. Auch hier bildet sich erst ein blaugrüner Co^{2+}-Cysteinkomplex (57), der mit Sauerstoff zum olivbraunen Co^{3+}-Cysteinkomplex oxidiert wird (58). Wegen seiner Stabilität kann kein Cystin entstehen (SCHUBERT 1932). Die Restmengen von Cystein, die einen Gaitonde-Komplex bilden, können entweder durch Ansäuern aus dem Co^{3+}-Cysteinkomplex freigesetzt

worden sein oder wegen eines Mangels an Kobalt^{2+}durch den unterbrochenen Katalysatorkreislauf nicht oxidiert worden sein.
Auch die anderen Kationen bilden z.T. mit Cystein Komplexe, oxidieren es aber nicht und bleiben im Sauren nicht stabil, so daß Cystein ungehindert mit dem Gaitonde-Reagenz reagieren kann. Versucht man den negativen Einfluß der untersuchten Anionen (Abb. 17) zu erklären, so geben die eigenen Untersuchungen nur für Schwefelwasserstoff Hinweise. Da Schwefelwasserstoff mit dem Gaitonde-Reagenz einen eigenen Komplex ergibt, wie dies zuvor dargestellt wurde, wird es den Cysteinnachweis hemmen, da diesem das Ausgangsprodukt Ninhydrin oder ein Zwischenprodukt entzogen wurde. Für die anderen Anionen liegen keine Erklärungen vor.
Die negative Interferenz von Gaitonde-negativen Verbindungen wurde bisher nur von HENSEL (1979) für Methionin (ab 0,5 mM), Homocystein (ab 5 mM) und Glutathion (ab 5mM, wobei ein roter Komplex auftritt) beobachtet. Die erhöhten Cysteinwerte in Gegenwart von N-Acetylcystein sind auf die Addition des von N-Acetylcystein allein und des von Cytein gebildeten Gaitonde-Komplexes zurückzuführen. Die Unterdrückung des Cysteinnachweises mit Ketosäuren, wie Thioglycolsäure, Mercaptopyruvat oder α-Keto-γ-Methiolbutyrat, liefert Hinweise auf den Reaktionsmechanismus. Eine Oxidation der Thiolgruppe, wie bei Sulfoessigsäure oder Cysteinsäure, ergibt ebenso keine Hemmung wie das Abspalten der Thiolgruppe zu Alanin oder Pyruvat. Das Fehlen der Ketogruppe bei Mercaptopropionsäure oder einem Alkohol, wie Mercaptoäthanol, zeigt auch keine Hemmung. Somit wird die Bedeutung der Thiol-, Amino- und Carboxylgruppe des Cysteins für die Gaitonde-Komplexbildung unterstrichen, wobei die Einführung der Ketogruppe zu einer irreversiblen Hemmung der Reaktion führt.
Die Aufreinigung des Gaitonde-Komplexes wurde durch zwei Faktoren erschwert. Zum einen konnte nur das Spektrum des rot-violetten Gaitonde-Komplexes als Nachweisreaktion gewählt werden. Es zeigte sich bald, daß das Verhältnis der UV-Bande bei 242 nm zur Gaitonde-Bande bei 560 nm bei der Aufreinigung abnahm und somit das einzige Reinheitskriterium darstellt. Ergänzende Hinweise lieferte die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Reaktionsansatzes, wobei sich einige UV-löschende Verbindungen abtrennen ließen. Zum anderen stellt die Labilität des Gaitonde-Komplexes zu einer braunen hydrophilen Verbindung das größte Problem dar. Der Gaitonde-Komplex wurde sogar nach Elution einer dünnschichtchromatographisch reinen Bande und deren Einengung im Dunkeln mit Stickstoff zu der genannten braunen Verbindung zerstört. Der Komplex ist daher nur in großer Verdünnung stabil. Deshalb erfolgte nach jeder Untersuchung, soweit möglich, eine Spektralanalyse.

Durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels kann die Zerstörung auf ein Minimum reduziert werden. Dabei war auch zu bedenken, daß Ruhemann's Purpur in Wasser, Alkoholen und Ketonen, nicht aber in Äther, Chloroform und apolaren Lösungsmitteln löslich ist (MEYER 1957). Aus den vergleichenden Extraktionen mit vielen Lösungsmitteln wurden die ausgewählt, die zu einer deutlichen Trennung von Ruhemann's Purpur und Gaitonde-Komplex führten. Alkohole und Ketone wie Aceton, schieden aus, da sie meist keine Phasentrennung von Säure und organischem Lösungsmittel ergaben. In apolaren Lösungsmitteln wie n-Hexan oder n-Heptan lösten sich beide nicht. Toluol schied auch aus, da beide nach längerer Zeit (über Nacht) zerstört wurden. Die Kohlenwasserstoffhalogenide waren zur Extraktion wenig geeignet, da Ruhemann's Purpur z.T. zu einer rötlichen Substanz zerstört wurde, die sich in der organischen Phase löste.
Benzol, Äthylacetat und Diäthyläther waren zur Extraktion am besten geeignet. Äther wurde das Mittel der Wahl, da es leicht flüchtig ist und so zu kurzen Einengzeiten am Rotationsverdampfer führte, wenngleich die vorhandenen Peroxide eine Zerstörung des Komplexes bewirken könnten. Benzol schied wegen seiner Kanzerogenität und Äthylacetat aus Kostengründen aus.
In der Dünnschichtchromatographie wurde Chloroform gerne als Laufmittelkomponente eingesetzt, da es das braune Zerfallsprodukt des Gaitonde-Komplexes meist zu diesem zurückbilden konnte, und zudem als billiges $CDCl_3$ für die NMR-Spektroskopie eingesetzt werden konnte. Es müssen gewisse Protonierungseffekte durch das saure Chloroform in Betracht gezogen werden. Die Auswahl der Laufmittelgemische geschah derart, daß System 1 und 2 (Tab. 12) möglichst alle UV-löschenden Nebenbanden gut abtrennten. Laufmittel 3 sollte nur eine Nachreinigung und Stabilisierung bewirken.
Versucht man nun aus den vorliegenden Daten einen Strukturvorschlag zu machen, so ist dies mit einigen Schwierigkeiten verbunden, da die vorliegenden NMR- und IR-Spektren (nicht dargestellt) keine eindeutige Interpretation zuließen. Obwohl eine dünnschichtchromatographisch reine Komplexbande nach dem 3. Laufmittel mit deuteriertem Chloroform sofort eluiert wurde, um dann im Dunkeln mit Stickstoff auf 500 µl eingeengt zu werden, lieferte diese Probe keine gut interpretierbaren Signale. Dies mag an der geringen Substanzmenge, deren genaues Gewicht wegen der Komplexzerstörung beim Einengen zur Trockene nicht ermittelt werden konnte , und der in einer anschließenden Spektralanalyse beobachteten Zerstörung des Komplexes durch die Versuchsbedingungen liegen. Es bleibt daher späteren Arbeiten vorbehalten, diese wichtigen und aussagekräftigen Daten zu gewinnen und so zu einer gesicherten Struktur zu gelangen.

Trotzallem soll schon jetzt versucht werden, einen Strukturvorschlag zu machen. Vergleicht man das Absorptionsspektrum (Abb. 2 ; 19) mit den aus der Literatur für Ninhydrinderivate bekannten Spektren, so kann eine Ähnlichkeit mit dem roten Oxazinradikal (XVI) des Ruhemann's Purpur erkannt werden, welches Absorptionsmaxima bei 560, 549, 310 und 254 nm im Verhältnis 1/0,1/0,25/0,22 mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von 64,3/6,9/16,4/14,5 x 10^6 cm^2 x mol^{-1} besitzt (MACFAYDEN 1950). Dieses Diketohydrindamin-diketohydrindyliden (XVI) wird aber nur in 1 M Schwefelsäure oder Essigsäure (MICHAELIS et al. 1941) und nicht in Salzsäure beobachtet. Zudem kann es durch Zugabe von 3 N Natronlauge in das violette Ruhemann's Purpur überführt werden, was mit dem Gaitonde-Komplex nicht möglich ist (3.3.1.4.4). Außerdem weist dieses Oxazinradikal nur eine Summenformel von $C_{18}H_9O_4N_1$ und ein Molekulargewicht von 303 m/e auf, was deutlich von dem des Gaitonde-Komplexes mit 503 m/e abweicht.



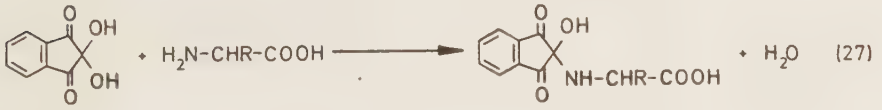
Oxazin (XVI)

Vergleicht man das Molekulargewicht, das aus dem Massenspektrogramm (Abb. 20 b) ermittelt wurde mit dem aus der Elementaranalyse berechneten Wert, so besteht eine Differenz von 56 m/e. Grund für diese Diskrepanz dürfte in der Labilität des Komplexes zu suchen sein, da stets kleinere Massen (Abb. 20) auftreten, wenn die Substanz zur Trockene eingeengt wird und als Festsubstanz auf den Probenkopf kam. Dampfte man den in Chloroform gelösten Gaitonde-Komplex kurz vor der Messung mit Stickstoff auf den Probenkopf auf, so treten erheblich mehr höhere Massenfragmente auf (Abb. 20a). Beim Einengen scheint der Komplex zu kleineren Molekülen zu zerfallen.

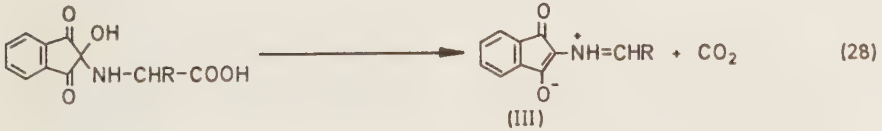
Da somit eine Kombination von Elementaranalyse und Massenspektrogramm nicht möglich ist, soll nur aus der Elementaranalyse entnommen werden, daß der Komplex nur ein Stickstoff und ein Schwefelatom enthält. Die (^{35}S)-Versuche (3.3.1.5.2) zeigten, daß kein (^{35}S)-Schwefelwasserstoff entwickelt wird. Das wenig befriedigende NMR-Spektrum ergab ein hohes Verhältnis von Indanring zu anderen Seitengruppen (10/1) und zudem keine freie Thiol- aber eine Ketogruppe.

Aus dem Versuch 3.3.1.5.1, wie auch aus der Literatur (VAN SLYKE et al. 1941) ist zudem bekannt, daß Aminosäuren unter sauren Bedingungen Kohlendioxid freisetzen, so daß diese Gruppe an dem Komplex nicht beteiligt sein dürfte.

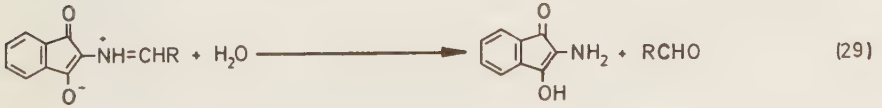
Für unsere Versuchsbedingungen kann McCALDIN (1960) zwischen pH 1 - 2,5 eine Reaktion von Ninhydrin (II) zu 2-Amino-1,3-indandion (IV), wie sie auch unter 3.1.1 ausführlich beschrieben ist (27 - 29),und weiter unter Desaminierung zu 2-Hydroxy-1,3-indandion (V) beobachten(30). Dieses reagiert mit einem weiteren Molekül Ninhydrin (II) zu seinem Reduktionsprodukt Hydrindantin (VIII) (57). Andererseits sollen Thiole, wie Schwefelwasserstoff Ninhydrin (II) sofort zu 2-Hydroxy-1,3-indandion (V) und mit weiterem Schwefelwasserstoff zu Hydrindantin (VIII) reduzieren (McCALDIN 1960, SCHÖNBERG und MOUBASHIER 1949). Da dieses nicht gefärbt ist scheidet es als Strukturvorschlag aus.



(II)
Ninhydrin

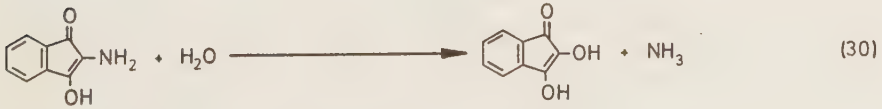


(III)



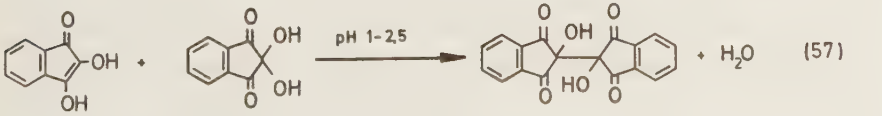
(III)

(IV)
2-Amino-indandion



(IV)
2-Amino-indandion

(V)
2-Hydroxy-indandion

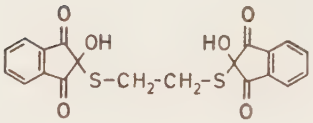


(V)
2-Hydroxy-indandion

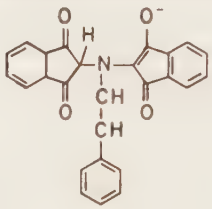
(II)
Ninhydrin

(VIII)
Hydrindantin

Betrachtet man die Reaktionsfreudigkeit der Seitengruppen des Ninhydrins, so scheint die mittelständige Carbonylgruppe ein guter Akzeptor für Additionsreaktionen zu sein. Wie bereits besprochen, addiert sich Prolin an diese Gruppe unter sauren Bedingungen (McCALDIN 1960) (46). An dieser mittelständigen Carbonylgruppe können sich auch Thiolgruppen, wie die des Äthandithiols, oder eine Aminogruppe, wie die des Phenylalanins mit ein oder zwei Ninhydrinmolekülen addieren (XVII, XVIII) (SCHÖNBERG und SINGER 1978). Die gleichen Autoren sehen in dem reaktiven Verhalten der mittleren Carbonylgruppe eine auffallende Übereinstimmung mit Formaldehyd, dessen analoge Reaktion mit Aminogruppen bekannt ist.

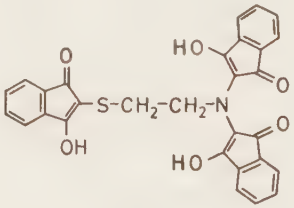


(XVII)



(XVIII)

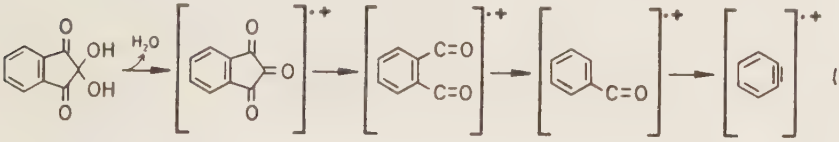
Für Cystein, das eine Thiol- und eine Aminogruppe enthält, sollte die vorgeschlagene Struktur (XIX) den beobachteten Eigenschaften am ehesten gerecht werden, wobei die mittlere Carbonylgruppe entweder mit der Thiol- oder Aminogruppe des Cysteins reagiert.



(XIX)

Dabei ging man von der Überlegung aus, daß maximal 3 Ninhydrinmoleküle (MG 160) mit einem Cysteinmolekül (MG 121) reagieren können, so daß sich ein rechnerisches Molekulargewicht von 601 m/e ergeben würde. Die Differenz zum tatsächlich gemessenen Molekulargewicht des Massenspektrums (MG 503) beträgt 98 m/e, die durch das Abspalten von 3 Molekülen Wasser und 1 Molekül Kohlendioxid erklärt werden können. Daß die Carbonylgruppe des Cysteins nicht im Komplex enthalten sein kann, wurde zuvor ausgeführt. Die vorgeschlagene Struktur (XIX) hat somit ein Molekulargewicht von 509 m/e und eine Summenformel von $C_{29}H_{19}N_1S_1O_6$. Die Differenz zum gemessenen Molekulargewicht kann durch eine Doppelbindung im Cysteaminteil verringert werden.

Die beobachteten Massenfragmente von 503, 458, 359 und 104 m/e zeigen den gleichen Ionisationsverlauf (Abb. 21), so daß sie dem Komplex zugeordnet werden können. Dabei kann das 359 m/e Fragment durch Abspalten eines Indanringes (144 m/e) aus dem Molekül (503 m/e) entstanden sein. Die Fragmente des Indanringes (132, 104 und 76 m/e) treten z.T. in sehr großen Mengen auf, was die vielen NMR-Signale bestätigt (58).



(58)

Ninhydrin m/e 178 m/e 160 m/e 132 m/e 104 m/e 76

In diesem Zusammenhang dürfte es interessant sein, daß nur Cystein mit einer freien Thiol-, Amino- und Carboxylgruppe, sei es ohne oder mit Hydrolyse, sowie einem bestimmten Abstand dieser Gruppen (C_3-Körper) den Gaitonde-Komplex bilden kann. Dabei scheint der elektrophile Einfluß der Carboxyl- und Thiolgruppe sowie der nucleophile Einfluß der Aminogruppe wichtig zu sein, da Homocystein, ein C_4-Homolog des Cysteins schon nicht mehr zur Komplexbildung gelangt. Hier können sich die genannten Einflüsse nicht über die zusätzliche $-CH_2$-Gruppe hin auswirken. Obwohl die Carboxylgruppe nicht im Komplex vorhanden ist, scheint sie bei der Komplexbildung nötig zu sein, da Cysteamin keine Färbung ergibt. Ein Fehlen der Aminogruppe ergibt wohl keinen Komplex, doch hindert sie Cystein diesen zu bilden, wie das Mercaptopyruvat, Thioglycolsäure und α-Keto-γ-Methiolbutyrat zeigen. Diese scheinen zu ungefärbten Produkten abzureagieren und somit dem Cystein das Ninhydrin und seine nötigen Zwischenprodukte zu entziehen. Die anderen bei der negativen Interferenz untersuchten Verbindungen zeigen keine Hinweise auf die Komplexbildung, müssen aber bei den Enzymtesten (3.7) berücksichtigt werden. Es sei noch erwähnt, daß Zugabe von Dithionit den Komplex unter Farbverlust reduzieren kann.

Zum ersten Mal kann aufgrund des Molekulargewichtes ein chemisch korrekter Extinktionskoeffizient für den Gaitonde-Komplex angegeben werden, der mit $1{,}6 \times 10^6$ $cm^2 \times mol^{-1}$ bei 560 nm 100-fach höher als der von GAITONDE (1967) genannte $27{,}1 \times 10^3$ $cm^2 \times mol^{-1}$ ist.

Abschließend sei noch einmal darauf hingewiesen, daß der saure Ninhydrinnachweis trotz seiner im Vergleich zu anderen Cysteinnachweismethoden hohen Spezifität nicht zur zweifelsfreien Cysteinbestimmung geeignet ist, da in vivo Gaitonde-positive Verbindungen gefunden wurden. Es sind daher alle Versuchsergebnisse aus der Literatur, die nur diesen Nachweis verwendeten, in Zweifel zu ziehen. Erst durch Vorschalten einer Vortrennung, wie mit der Trisacryl-GF05-Säule (3.1) oder einer Dünnschichtelektrophorese (3.3.3.2) kann die Natur des Gaitonde-positiven Materials ermittelt werden, deren routinemäßige Bestimmung mit dem Gaitonde-Reagenz erfolgen kann. Dies gilt in besonderem Maße für die Aminosäureextraktion aus biologischem Material.

3.3.2 Trennverfahren

3.3.2.1 Dünnschichtchromatographie

Eine Trennung von schwefelhaltigen Aminosäuren ist mittels Dünnschichtchromatographie möglich (Tab.15), doch waren die Trennergebnisse oft wenig befriedigend da stark verschmierende Banden, besonders bei d), auftraten. Am besten scheint Trennsystem c) zu sein, wenngleich Cysteinäthylester besser mit System b) getrennt werden kann. Die Doppelbanden von O-Acetylserin und Cysteinäthylester in den Systemen c) und e) können schwer erklärt werden.

Tab. 15 : Dünnschichtchromatographie von Aminosäuren

Verbindung	Laufmittel				
	a)	b)	c)	d)	e)
L-Cystein	0,26	0,38	0,28	0,68	0,36
L-Cystin	0,00	f	0,08	0,08	0,10
S-Sulfocystein	0,76	0,59	0,51	0,25	0,10
L-Cysteinsäure	0,56	0,45	0,34	0,25	0,44
L-Cysteinäthylester	0,70	0,90	0,60 0,75	0,93	0,47 0,74
O-Acetyl-L-Serin	0,56	0,43	0,32 0,40	0,50	0,15 0,35
L-Serin	0,44	0,50	0,34	0,45	0,31
L-Alanin	0,52	0,66	0,39	0,27	0,48

Es wurden analytische Kieselgel-GF_{254}-Platten mit folgenden Laufmitteln verwendet :

a) Äthanol/Wasser (7/3); b) Äthanol/Ammoniak (33%) (77/23); c) n-Propanol/Wasser (64/36);

d) Aceton/Ammoniak (33%)/Wasser (20/1/4); e) Chloroform/Äthanol/Eisessig/Wasser (50/32/10/8) nach FLOSS et al. (1976) und KREDICH und TOMKIN (1966).

3.3.2.2 Dünnschichtelektrophorese

Die Dünnschichtelektrophorese liefert dagegen erheblich bessere Ergebnisse (Tab. 16), da scharfe Banden auftraten. Allgemein sind die Trennungen auf Cellulosegel denen auf Kieselgel vorzuziehen. Die meisten schwefelhaltigen Aminosäuren werden bei pH 5,8 besser als bei pH 2,0 getrennt, obwohl das letzte System zum Nachweis von Cysteinestern geeigneter erscheint.

Tab. 16 : Dünnschichtelektrophorese von Aminosäuren

Aminosäure	Kieselgel-GF_{254}		Cellulosegel	
	pH 2,0	pH 5,8	pH 2,0	pH 5,8
L-Cystein	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0
S-Sulfocystein	+1,9	+0,3	+1,2	+3,5
L-Cysteinsulfinsäure	+1,6	+0,2	f	f
L-Cysteinsäure	+2,1	+0,4	+0,6	+3,7
L-Cysteinmethylester	-1,9 -0,9	-0,7 -0,4	-2,1	-2,5
L-Cysteinäthylester	-1,8 -0,6	-0,7 -0,3	-1,9	-2,4
L-Cystin	-0,9	-0,9	-1,3	-1,0
S-Carbamoyl-L-Cystein	-1,6	-1,1	-0,9	-1,0
L-Homocystein	-1,0	-1,1	-1,5	-1,2
ß-Cyanoalanin	-1,8	-1,1	-0,8	-1,1
L-Alanin	-1,8	-1,2	-1,8	-1,2
O-Acetyl-L-Serin	-1,5	-1,1	-1,0	-1,3

Es wurden analytische Kieselgel-GF_{254}- bzw. Cellulose-Platten verwendet, die mit einem Elektrophoresepuffer pH 2, der aus Ameisensäure (90%)/Eisessig (17/57) bestand, oder pH 5,8, einem 0,16 M Citratpuffer, besprüht wurden. In einer Dünnschichtelektrophorese erfolgte die Trennung bei 1000 V konstanter Spannung. Der Strom betrug, je nach Feuchtigkeit, 30 mA und die Leistungsaufnahme 30 W. Es wurden stets 100 nmol der jeweiligen Aminosäure aufgetragen und 30 Minuten getrennt.
Die R_e-Werte werden auf L-Cystein (R_e = -1) bezogen. Alle zur Anode wandernden Substanzen tragen (+)-Werte, alle zur Kathode wandernden Verbindungen (-)-Werte. Der Nachweis erfolgte mit dem sauren Ninhydrinreagenz (2.2.3.2). ß-Cyanoalanin wies statt der roten eine blaue oder grüne Farbe auf.

3.3.2.3 Ionenaustauscherchromatographie an Dowex 50 WX 8

Diese Säule wurde hauptsächlich zur Vortrennung von schwefelhaltigen Verbindungen, wie den Gaitonde-positiven in vivo Verbindungen (3.6) und den Reaktionsprodukten der "S-Sulfocysteinsynthase" (3.7.4) eingesetzt.
Im Stufenverfahren können nur Verbindungen mit negativen und positiven Gesamtladungen getrennt werden. So eluiert man in der Durchlauf- und Wasserfraktion (2.3.4) Verbindungen mit negativer Nettoladung wie Taurin, S-Sulfocystein, Cysteinsäure, Homocysteinsäure, Glutathionsäure, N-Acetylserin und

in geringerem Maße Cysteinsulfinsäure (eigene Ergebnise; UBUKA et al. 1980b; HARRINGTON und SMITH 1980; KREDICH und TOMKIN 1966). Verbindungen mit einer positiven Nettoladung werden nur leicht gebunden und können mit 5 ml 3 M Ammoniumhydroxid eluiert werden, wie dies für L-Cystein, S-Methylcystein und Methionin beobachtet wird. Phosphoserin, Homocystein, Homocystin, Cysteamin, S-Methylcysteinsulfoxid, Glutathion und Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure werden stärker gebunden und können nur mit 15 ml 3M Ammoniumhydroxid ausgewaschen werden (eigene Ergebnisse). Auch Methioninsulfon und Cystathioninsulfon (HARRINGTON und SMITH 1980) sowie Serin und O-Acetylserin (SMITH 1977) sollen zu dieser Gruppe gehören. O-Acetylserin erfährt bei der basischen Elution eine Acylumlagerung zum N-Acetylserin, welches sofort eluiert wird.
Bei einem kontinuierlichen Gradienten (2.3.4) können S-Sulfocystein und L-Cystein gut getrennt werden, was für die Produktanalyse der "S-Sulfocysteinsynthase" von großer Bedeutung ist.

3.3.3 Enzymatische Cysteinnachweismethoden

Während die bisher genannten Cysteinnachweisverfahren nur eine Gesamtbestimmung von L- und D-Cystein ermöglichten, so sind die im Folgenden zu besprechenden enzymatischen Methoden stereospezifisch. Auf diese Weise können z.B. die Hydrolyseprodukte des Gaitonde-Reagenzes (3.3.1.2.2) und die Reaktionsprodukte der Cysteinsynthase (3.7.3.1) auf ihre Stereospezifität hin untersucht werden. Dazu sind besonders die aus tierischen Systemen bekannten Aminosäureoxidasen sowie die aus pflanzlichenm Material gereinigten Cysteindesulfhydrasen geeignet.

3.3.3.1 Cysteindesulfhydrasen

Eine stereospezifische Cysteinanalyse kann mit den aus Chlorella gewonnenen Cysteindesulfhydrasen durchgeführt werden. An dieser Stelle sollen nur kurz die Eigenschaften der D-Cysteindesulfhydrase dargestellt werden (SCHMIDT 1983), während die der L-Cysteindesulfhydrase unter 3.7.2 näher erläutert werden.
Bei Chlorella wird die D-Cysteindesulfhydrase an der DEAE-Sephadex-Säule (Abb. 37) vor der L-Cysteindesulfhydrase abgetrennt. Das Enzym hat ein pH-Optimum bei pH 9,0 und einen K_m-Wert bezüglich D-Cystein von 0,16 mM. Es ist nur für D-Cystein spezifisch. Nur Cysteamin wird etwas umgesetzt (2%). L-Cystein, L- und D-Cystin, L-Cysteinmethyl- und -äthylester, N-Acetyl-L-Cystein, Mercaptopyruvat und Mercaptoessigsäure zeigen keine nennenswerte Umsätze (SCHMIDT 1983). Die für unsere Versuche verwendete D-Cysteindesulf-

hydrase enthielt noch 7,5 % L-Cysteindesulfhydraseaktivität. Es sei noch erwähnt, daß das Verhältnis von Schwefelwasserstoff/Ammoniak/Pyruvat bei pH 9,0 8,9/2,5/1 beträgt.

3.3.3.2 Aminosäureoxidasen

Ein weiteres stereospezifisches Nachweisverfahren stellen die Aminosäureoxidasen dar, die sogar käuflich sind. In Tab. 17 wird die Substrat- und Stereospezifität dieser Enzyme dargestellt.

Tab. 17 : Substratspezifität der Aminosäureoxidasen

Aminosäure	Sauerstoffverbrauch (nmol/mg Protein/min)			Ketosäurebildung (nmol/mg Protein/min)		
	Autoxidation (nmol/min)	L-Aminosäure-oxidase	D-Aminosäure-oxidase	Autoxidation (nmol/min)	L-Aminosäure-oxidase	D-Aminosäure-oxidase
L-Cystein	0,4	70,4	8,0	2,5	316,6	447,6
D-Cystein	0,0	0,0	8,0	2,3	0,1	9819,0
S-Sulfo-L-Cystein	0,0	10,4	6,4	2,2	246,7	225,6
L-Cystin	0,5	51,2	8,0	54,1	1363,0	275,0
D-Cystin	0,1	11,2	28,0	26,9	5,6	9546,4
L-Cysteinäthylester	0,8	8,0	320,0	10,2	71,2	87,7
L/D-Homocystein	1,1	12,0	352,0	18,2	1496,0	1543,0
Cysteamin	0,6	8,0	104,0	1,0	9,0	23,7
Taurin	0,0	2,1	16,0	1,0	73,6	218,0
L-Methionin	0,0	24,0	56,0	1,6	1583,9	214,3
D-Methionin	0,0	20,8	480,7	1,6	1,1	24317,2
L-Alanin	0,0	20,8	480,7	1,8	13333,4	1,4
D-Alanin	0,0	0,8	1146,6	1,8	35,6	22999,0
L-Cysteinsäure	0,0	0,0	0,0	0,0	156,7	24,8
L-Cysteinsulfinsäure	0,0	0,0	0,0	61,7	182,8	144,8

Die genannten Aminosäuren wurden mit den käuflichen Aminosäureoxidasen in dem unter 2.5.10.1 und 2.5.10.2 beschriebenen Testansätzen umgesetzt. Dabei konnte sowohl der Sauerstoffverbrauch wie auch die Ketosäurebildung bestimmt werden. Außer S-Sulfocystein (10 mM) wurden alle Aminosäuren in einer Konzentration von 40 mM eingesetzt. Von den enzymatisch gemessenen Oxidasewerten wurde jeweils die Autoxidation bzw. der Nullwert abgezogen. Alle Phenylhydrazonderivate wurden bei 324 nm gemessen, wenngleich die Absorptionsmaxima, wie unter 3.1.5 näher ausgeführt, bei unterschiedlichen Wellenlängen lagen.

Es fällt auf, daß auch ohne Enzymzusatz z.T. hohe Nullwerte auftreten, die bei der Sauerstoffaufnahme auf Autoxidation der Verbindungen und bei der Ketogruppenanalyse auf unbekannte Reaktionen der Aminosäuren mit dem Phenylhydrazin zurückzuführen sind. Es ist bekannt, daß Kupfer-(II)-Ionen die Autoxidation von Cystein beschleunigen. Für unsere Testbedingungen ohne Enzymzusatz wurde bei 0,5 µM Kupfer-(II)-Ionen 0,4 µmol/min Sauerstoffverbrauch beobachtet. Auch L- und D-Cystein, Cysteamin, Glutathion, sowie in geringem Maße Cysteinester,

Dithioerythrit und Mercaptoäthanol werden in gleicher Weise oxidiert (FELDMAN et al. 1982). Diese geringen Kupferspuren können als Verunreinigungen auch in unserem Test enthalten sein. Besonders der Trispuffer wäre zu nennen, da Tris-Cu^{2+}- und $Tris_2$-Cu^{2+}-Komplexe Cystein oxidieren können (TAKAHASHI et al. 1981). Es sei noch erwähnt, daß Cyanidionen die Autoxidation hemmen (KOBASHI 1968). Die Nullwerte müssen getrennt ermittelt und bei der Berechnung der Enzymumsätze berücksichtigt werden.

Zudem ist zu erwähnen, daß zwischen Sauerstoffverbrauch und Ketogruppenbildung der Autoxidation bzw. der Enzymwerte quantitative und qualitative Unterschiede auftreten, die mehrere Ursachen haben können. Dabei muß auch an andere sauerstoffverbrauchende Reaktionen, wie die Thioloxidation zu Cysteinsulfinsäure und Cysteinsäure gedacht werden, da der Sauerstoffverbrauch erheblich (10^2)höher als die Ketogruppenbildung ist. Unter unseren Bedingungen (2.5.10) wird für die Autoxidation von Cystein ein Sauerstoffverbrauch von 400 nmol/min, eine Mercaptopyruvatbildung von 2,5 nmol/min und eine Abnahme der Thiolgruppe von 187 nmol/min (bei 37^{o} C, hochgerechnet nach KRÄMER 1983) bestimmt.

Prinzipiell liegen die Umsätze der L-Aminosäureoxidase deutlich unter denen der D-Aminosäureoxidase, wobei erstere stereospezifisch zu sein scheint. Die Daten der Ketogruppenbildung sind aussagekräftiger, da hier direkt das Reaktionsprodukt ermittelt wird, während beim Sauerstoffverbrauch auch andere Reaktionen beteiligt sein können. Trotzallem scheinen beide Nachweisverfahren nötig zu sein, da gerade bei Cystein unterschiedliche Ergebnisse bei den Enzymen beobachtet werden. So kann D-Cystein mit der Aminosäureoxidase über den Sauerstoffverbrauch überhaupt nicht bestimmt werden, während L-Cystein nur geringe Mercaptopyruvatbildung zeigt.

Es sei noch erwähnt, daß diese Versuche mit tierischen Aminosäureoxidasen durchgeführt wurden, inzwischen aber auch Aminosäureoxidasen aus Chlorella von uns beobachtet wurden, deren Spezifität noch nicht bekannt sind(siehe 4.3).

3.3.4 Diskussion

Die dargestellten Nachweisverfahren geben die Möglichkeit zum analytischen und präparativen Cysteinnachweis.

Die Dünnschichtchromatographie ist wegen der starken Salzeffekte nur in wenigen Fällen zur Produktanalyse geeignet. Die Dünnschichtelektrophorese wird besonders bei den Hydrolyseversuchen (3.3.1.2.2) eingesetzt, um die Ergebnisse der Trisacryl GF05-Säule zu überprüfen. Der Einsatz der Aminosäureoxidasen ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Die Autoxidationsraten weichen bezüglich des Sauerstoffverbrauches und der Ketogruppenbildung stark voneinander ab (Tab, 17).

Sie sind für L- und D-Cystein, Cysteamin, reduziertes Glutathion, Cysteinäthylester, DTE und Mercaptoäthanol beschrieben (FELDMAN et al. 1982).
Die Enzymaktivitäten der tierischen Aminosäureoxidasen zeigen nach Abzug der Autoxidation große Unterschiede. Die Unspezifität (Tab. 17) wurde auch für Proteus und Schlangenserum beobachtet (CHEN et al. 1971). Die Cysteindesulfhydrasen sind wegen ihrer Spezifität (3.3.3.1) zur Bestimmung von L- und D-Cystein besser geeignet. Sie werden daher bei den Hydrolyseversuchen (3.3.1.2.2) und der Produktanalyse (3.7.3.1) eingesetzt.

3.4 Untersuchungen zur Regulation des N- und S-Stoffwechsels

Im Folgenden sollen Versuche dargestellt werden, die Aufschluß über die Regulation von Enzymen des S- und N-Stoffwechsels geben. Der Hauptteil der Untersuchungen wurde an der Grünalge Chlorella fusca Stamm 211-8b durchgeführt. Außerdem ließ man einige Blaualgen, vor allem Synechococcus PCC 6301, Rotalgen, Grünalgen und Lemna minor auf einer kleineren Anzahl von schwefelhaltigen Verbindungen wachsen. Nachdem man von allen Kulturen Rohextrakte (2.1.1.2) hergestellt hatte, wurden dann folgende Enzymaktivitäten ermittelt.
Dabei handelt es sich zum einen um Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion wie die Sulfataktivierung, die als Summe der ATP-Sulfurylase und APS-Sulfotransferase bestimmt wird, und der Cysteinsynthase, zum anderen um cysteinabbauende Enzyme, wie die L- und D-spezifischen Cysteinsulfhydrasen, sowie um die Thiosulfatreduktase und die S-Sulfocysteinsynthase, auf deren Stellung im Stoffwechsel noch unter 3.7.4 eingegangen werden soll. Als Enzym des N-Stoffwechsels bestimmte man die Glutaminsynthetase, da sie über Thioredoxin mit dem S-Stoffwechsel verbunden ist (SCHMIDT 1981). Bei der Chlorophyllbestimmung fiel ein in Methanol unlöslicher Niederschlag an, aus dem die Menge an gebundenem Sulfid ermittelt werden kann, welches aber nicht mit dem "gebundenen Sulfid", das unter 3.5 aufgereinigt wurde, verwechselt werden darf und auch dort diskutiert wird.

Beim Vergleich der dabei gemessenen Ergebnisse galt es, ein Bezugssystem zu finden, das die Diskussion erleichtert. Dazu werden die Werte des Wachstums auf Natriumsulfat herangezogen, da Sulfat die in vivo am häufigsten genutzte S-Quelle ist. Da die Wachstums- und Enzymwerte gewissen Schwankungen unterworfen sind, die auf Versuchsfehler und jahreszeitliche Einflüsse, wie dies für die Cysteinsynthase vermutet wird, zurückgeführt werden könnten, betrachtet man alle Werte, die im Vertrauensbereich von 66 % des Mittelwertes plus minus der einfachen

Standardabweichung des Sulfatwertes liegen, als Normalwerte. Alle anderen Ergebnisse sind signifikant höher oder niedriger und somit zu diskutieren.

Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme sind entweder auf den Chlorophyll- oder den Proteingehalt der Proben bezogen, so daß ein Vergleich der Tabellen untereinander nicht immer möglich ist. Meistens wird der Chlorophyllgehalt herangezogen, da seine Bestimmung einfacher und reproduzierbarer ist als der Proteinnachweis. Erst im Laufe der Untersuchungen stand ein akzeptabler Proteinnachweis (2.2.2) zur Verfügung, der nicht durch Thiole gestört wird.
In die folgenden Tabellen werden nur die spezifischen Aktivitäten der Enzyme übernommen. Dabei stellt sich das Problem der Berechnung der Ergebnisse bei Kulturen, die nur sehr schlecht gewachsen sind. Da sie nur wenig Chlorophyll- bzw. Proteingehalt aufweisen, werden die Substratumsätze bei der Berechnung der spezifischen Aktivität hochgerechnet, so daß kleine Fehler bei der Enzymberechnung oder Chlorophyll- bzw. Proteinbestimmung zu großen Endwertfehlern führen können. Dies ist besonders bei Kulturen der Fall, die z.B. für Chlorella nur 0,02 mg Gesamtchlorophyll in 750 ml Medium enthalten und somit nur wenig Rohextrakt ergeben. Um akzeptable Enzymumsätze zu erhalten, müßten daher große Rohextraktmengen in die Teste eingesetzt werden, was aber oft an der beschränkten Rohextraktmenge scheitert. Dies erreicht man durch größere Kulturansätze, doch können beim Einsatz von mehreren Pirsonflaschen (750 ml) wegen der nicht genau dosierbaren Animpfmenge an Algen Unterschiede im physiologischen Zustand auftreten, die einer in einer Pirsonflasche gewachsenen homogenen Kultur nicht vergleichbar sind.

3.4.1 Kinetik der Enzymregulation

Bevor die Ergebnisse beim Wachstum unter Standardbedingungen, d.h. bei 5-tägigem Wachstum auf einer gewissen Verbindung (Tab. 18), dargestellt werden können, muß der Verlauf des Wachstums und der Enzymaktivitäten von der frühen exponentiellen bis zur stationären Phase einer Kultur untersucht werden. Diese Kinetik wurde sowohl an einer Kultur, die auf 2×10^{-4} M Natriumsulfat gewachsen war, sowie an einer Schwefelmangelkultur (S-Mangelkultur) durchgemessen, um die Spannbreite der Enzymaktivitäten unter solch grundverschiedenen physiologischen Zuständen am 5. Tag zu kennen. Für diese Daten sei Frau Biedlingmeier gedankt. Dazu impfte man 18 Pirsonflaschen, die entweder SO_4-Medium oder S-Mangelmedium (2.1.1.1) enthielten, an. Nach dem Animpfen erntete man alle 24 Stunden ein oder mehrere Flaschen ab (2.1.1.2) und stellte einen Rohextrakt her. Nach 24 und 48 Stunden benötigte man jeweils 5, nach 72 Stunden 3 und die weiteren Tage jeweils eine Flasche. Aus den ganzen Zellen gewann man durch Methanol-

extraktion den Chlorophyllgehalt (2.2.8), sowie aus dem Rückstand die Menge an "gebundenem Sulfid" (2.5.6). Aus dem Rohextrakt wurde der Proteingehalt (2.2.2) bestimmt. Er wurde auch zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der Sulfataktivierung (2.4.7), der Cysteinsynthase (2.4.1), der S-Sulfocysteinsynthase (2.4.2), der Thiosulfatreduktase (2.4.4), der Glutaminsynthetase (2.4.8) sowie der L- und D-Cysteindesulfhydrase (2.4.3) eingesetzt. Im besonderen war es nötig, die entsprechenden Nullwerte zu bestimmen, um die vielleicht im Rohextrakt enthaltenen positiv reagierenden Substanzen von dem Testwert abziehen zu können.

Läßt man Chlorella in der zuvor beschriebenen Weise im S-Mangelmedium oder Sulfatmedium wachsen und bestimmt dabei den pH-Wert (Abb. 24), so ist eine starke Veränderung zu alkalischen pH-Werten, besonders bei der Sulfatkultur, zu beobachten . Dies beruht auf den batch-Bedingungen, wobei die Algen dem Medium Ionen entziehen und ihrerseits andere Verbindungen ausscheiden.

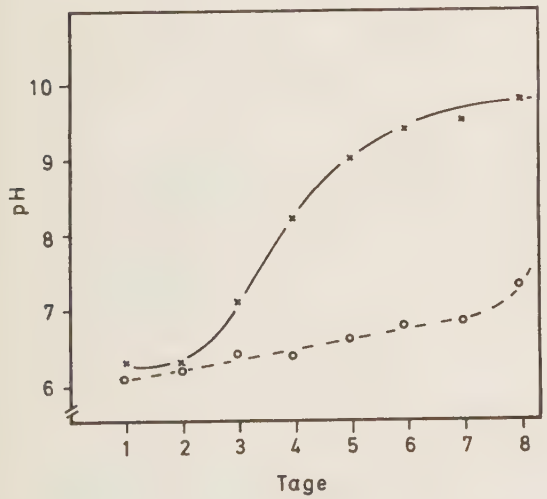


Abb.24 :

Kinetik des pH-Wertes des Mediums bei Chlorella fusca

x —— x Sulfatkultur

o - - - o S-Mangelkultur

Eine S-Mangel- und Sulfatkultur wurde in der in Abb. 26 beschrieben Weise angezogen. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (2.1.1.2) bestimmte man den pH-Wert des Mediums.

Die drastische pH-Veränderung hat auch einen Einfluß auf die Stabilität und die Aufnahme der unter 3.4.2 eingesetzten schwefelhaltigen Verbindungen, der nur schwer abzuschätzen ist. Scheiden die Algen z.B. Schwefelwasserstoff aus, so wird dieser in der frühen exponentiellen Phase noch entweichen können, wohingegen er in der stationären Phase abgefangen wird. Die geringe pH-Veränderung der S-Mangelkultur beruht auf dem langsamen Wachstum und folglich dem geringen Stoffwechsel, der erst nach 8 Tagen zu pH-Verschiebungen führt.

Als exponentielle Wachstumsphase kann, gemessen als $OD_{680\ nm}$ oder Zellzahlvermehrung, das Wachstum, bei der Sulfatkultur bis zum 4. Tag und bei der S-Mangelkultur bis zum 2. Tag bezeichnet werden (Abb. 25). Die späte exponentielle Phase erstreckt sich bis zum 6. Tag bzw. zum 4. Tag, um dann in die stationäre Phase überzugehen.

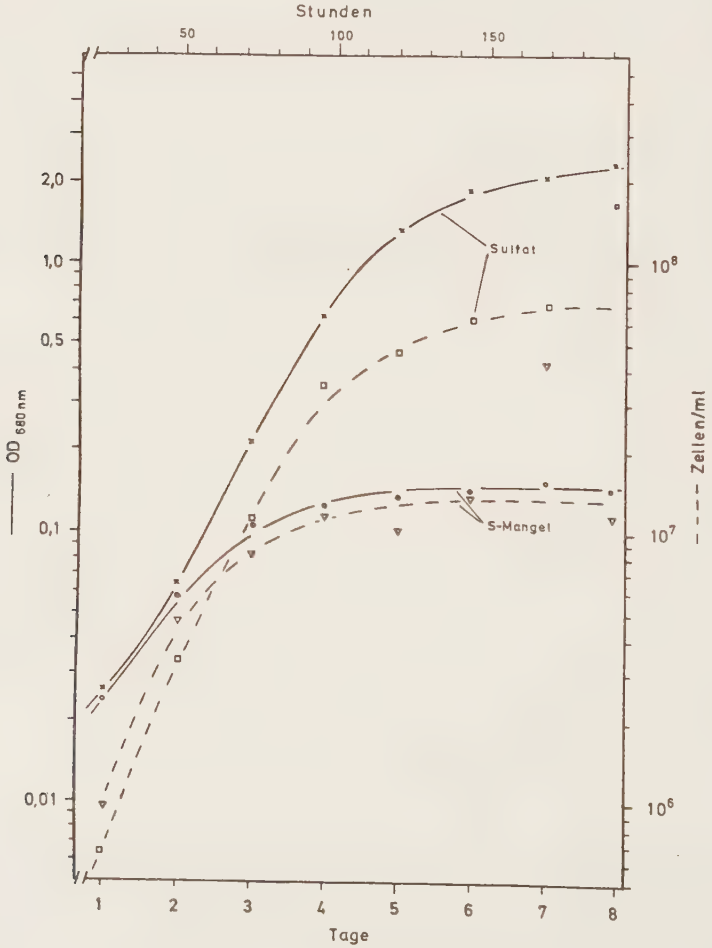


Abb. 25 : Wachstumskinetik von Chlorella fusca auf Sulfat- bzw. Schwefelmangelmedium.

Das S-Mangel- und Sulfatmedium wurde, wie unter 2.1.1.1 beschrieben, hergestellt und mit Chlorellazellen in Pirson-Flaschen angeimpft. Nach jeweils einem Tag entnahm man die unter 3.4.1 genannte Anzahl von Flaschen, bestimmte nach 2.1.1.2 die optische Dichte bei 680 nm und die Zellzahl.

Die Kenntnis dieser Daten ist für die Interpretation der physiologischen Untersuchungen von großer Wichtigkeit, auf die unter 3.4.5 näher eingegangen werden soll. Es sei noch darauf hingewiesen, daß diese Kinetik nur für Pirson-Flaschen bei 27°C ermittelt wurde und nicht auf 10 l-Flaschen übertragen werden kann.

Das Gesamtchlorophyll und das Gesamtprotein nehmen bei der Sulfatkultur in den ersten 3 Tagen deutlich zu, um nach 5 Tagen die stationäre Phase zu erreichen. Sie zeigen einen fast identischen Verlauf. Die S-Mangelkultur nimmt in den ersten beiden Tagen zu, um dann die stationäre Phase bei geringem Chlorophyll- und Proteinabbau zu erreichen(Abb. 26).

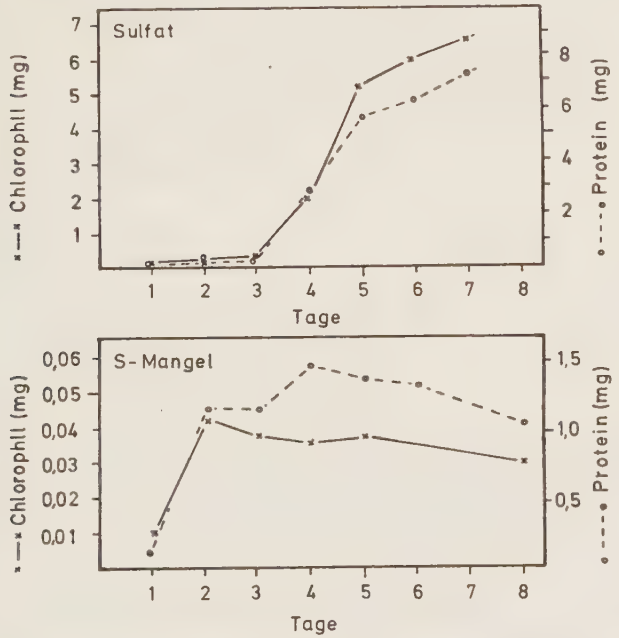


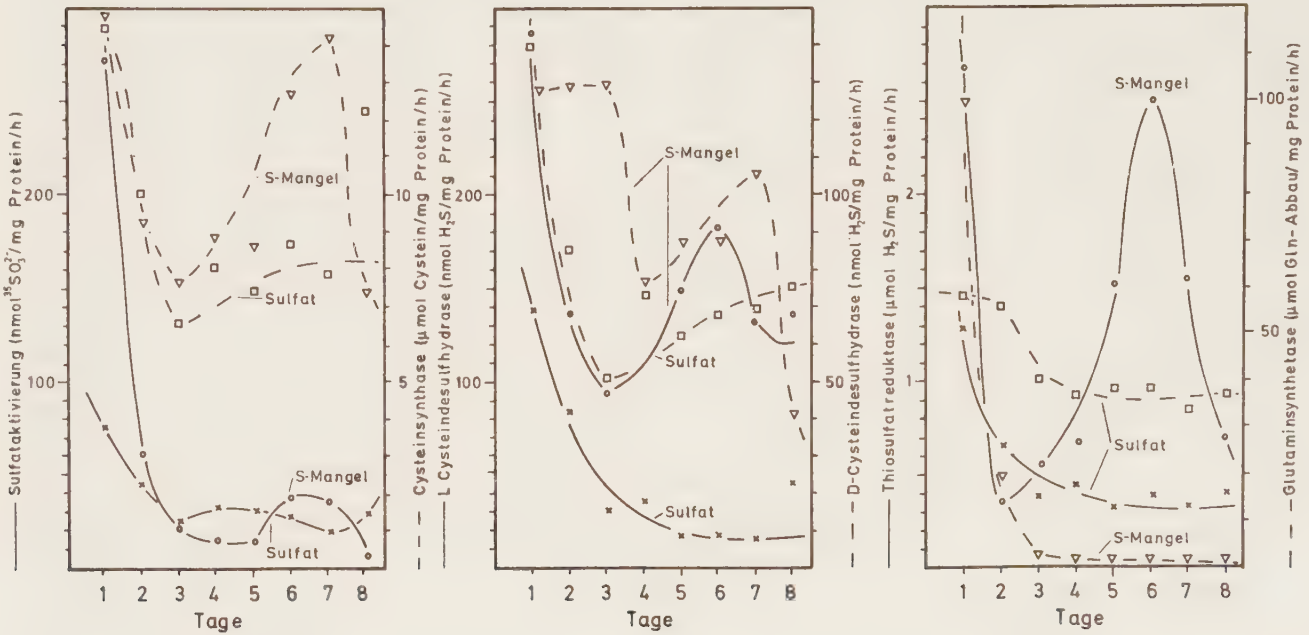
Abb. 26 : Kinetik der Gesamtchlorophyll- und -proteinbildung bei Chlorella

Die S-Mangel- und Sulfatkultur wurde in der in Abb. 25 beschriebenen Weise angesetzt. Nach jeweils einem Tag ermittelte man das Gesamtchlorophyll der Kultur nach 2.2.1 und das Gesamtprotein nach 2.2.2 aus dem nach 2.1.1.2 hergestellten Rohextrakt. Es wird stets das Gesamtchlorophyll bzw. -protein einer Pirson-Flasche (750 ml) angegeben.

Im Folgenden soll auf die einzelnen Enzyme eingegangen werden (Abb. 27), wobei die spezifische Aktivität auf den Chlorophyll- oder Proteingehalt bezogen wird.

Die Sulfataktivierung der Sulfatkultur ist sowohl auf Chlorophyll- wie auch auf Proteinbasis z.T. deutlich geringer als bei der S-Mangelkultur, wobei sie stets

x ——— x bzw. □ - - - - □ Meßwerte der Sulfatkultur ; o ——— o bzw. ▽ - - - - ▽ Meßwerte der S-Mangelkultur



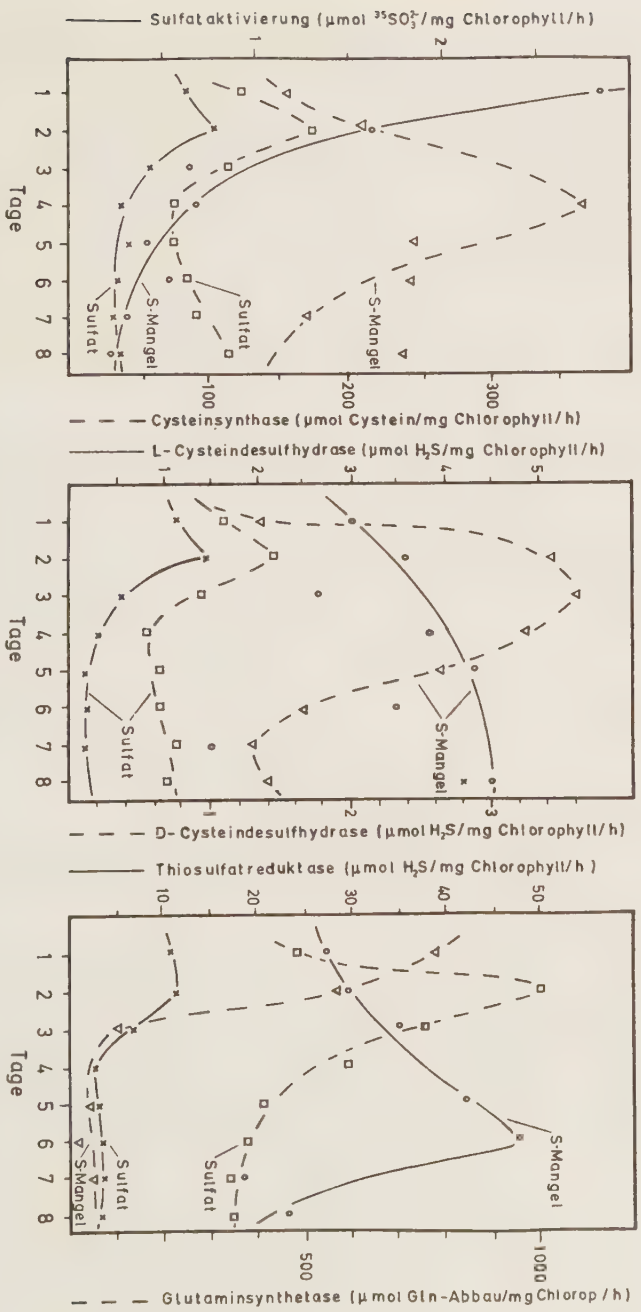


Abb. 27 : Kinetik der Enzymregulation bei Chlorella fusca

Die S-Mangel- und Sulfatkultur wuchsen in der in Abb. 26 beschriebenen Weise. Nach Gewinnung eines Rohextraktes nach jeweils 24 Stunden (2.1.1.2) bestimmte man die angegebenen Enzyme nach 2.5.1, 2.5.3 - 2.5.7. Die Einheiten auf Chlorophyll (a) oder Proteinbasis (b) sind auf den Ordinaten vermerkt.

vom zweiten Tag an drastisch abnimmt. Nur die Werte der Sulfatkultur weisen am 2. Tag ein Maximum auf.

Die Cysteinsynthase ist bei der S-Mangelkultur deutlich höher als bei der Sulfatkultur. Bezogen auf Chlorophyll nimmt sie bis zum 4. Tag bei der S-Mangelkultur zu, um dann auf den Ausgangswert zurückzugehen. Bezieht man die Meßdaten auf Protein, so nimmt die Cysteinsynthaseaktivität bis zum 3. Tag ab, um bei der Sulfatkultur ein Plateau zu erreichen, während die S-Mangelkultur am 7. Tag ein Maximum erreicht.

Die L-Cysteindesulfhydrase der Sulfatkultur nimmt auf Chlorophyllbasis bis zum 2. Tag zu, um dann abzunehmen und ist deutlich geringer als bei der S-Mangelkultur, die stetig zunimmt. Dies Verhalten weicht deutlich von dem der Cysteinsynthase ab. Auf Proteinbasis nimmt die Aktivität bei der Sulfatkultur stetig und beim S-Mangel bis zum 3. Tag ab, um am 6. Tag ein Maximum zu erreichen.

Die D-Cysteindesulfhydrase zeigt ein ähnliches Verhalten, wobei wieder die Werte für die Sulfatkultur deutlich geringer als die der S-Mangelkultur sind. Auf Chlorophyllbasis zeigt die S-Mangelkultur am 3. Tag ein Maximum, was vom Verhalten der L-Cysteindesulfhydrase abweicht. Auf Proteinbasis nimmt die Sulfatkultur bis zum 3. Tag ab. Die S-Mangelkultur zeigt anfangs ein Plateau, um am 4. Tag ein Minimum und am 7. Tag ein Maximum zu haben.

Die Thiosulfatreduktase zeigt bei der Sulfatkultur kaum eine Veränderung auf Chlorophyllbasis, während sie bei S-Mangel bis zum 6. Tag zunimmt. Dieses Maximum kann auch auf Proteinbasis beobachtet werden, wohingegen die Sulfatkultur stetig sinkende Aktivitäten aufweist.

Die Glutaminsynthetase besitzt im Gegensatz zu den anderen Enzymen bei S-Mangel geringere Werte, die bei beiden Bezugssystemen stetig abnehmen. Die Sulfatkultur auf Chlorophyllbasis zeigt am 2. Tag ein Maximum, während sie auf Proteinbasis nur leicht abnimmt.

Für die Betrachtung der unter 3.4.2 dargestellten Ergebnisse ist nur der 5. Tag von Bedeutung. Die in diesem Abschnitt gemachten Beobachtungen zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen S-Mangel und einer Sulfatkultur, der bei der Diskussion des Wachstums und der Enzymregulation auf den verschiedenen Verbindungen beachtet werden muß. Da es technisch nur schwer durchführbar wäre, Zeitkinetiken für jede Verbindung zu erstellen, kann oft nicht entschieden werden, ob die jeweilige Verbindung unter Standardbedingungen ein S-Mangelwachstum oder eine spezifische Beeinflußung aufweist.

3.4.2 Enzymregulation unter Standardbedingungen

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse beziehen sich nur auf die Tab. 18 und 19 und können angesichts der Datenfülle und der verschiedenen Organismen nicht leicht übersichtlich dargestellt werden. Deshalb sollen die einzelnen Enzyme getrennt abgehandelt werden, wobei die Ergebnisse von Chlorella zuerst zur Sprache kommen sollen, bevor auch die von Synechococcus 6301 und anderer Organismen zum Vergleich angeführt werden. In einer Abschlußdiskussion wird versucht, diese Beobachtungen mehrerer Organismen für ein Enzym zusammenzufassen und zu erklären. Die generellen Folgerungen bezüglich der Wirkung einer Verbindung bleiben einer Abschlußdikussion 3.4.5 vorbehalten.

Die Standardkonzentration der eingesetzten Verbindungen betrug, wenn nicht anders vermerkt, 3×10^{-4} M. Die Sulfatkonzentration der Sulfatkultur, auf die alle Ergebnisse bezogen werden, wurde bei Chlorella fusca 2×10^{-4} M und bei Synechococcus 6301 3×10^{-4} M eingesetzt. Die Medien wurden, wie unter 2.1.1.1 beschrieben, hergestellt. Die Zugabe der einzelnen Verbindungen erfolgte zum Teil vor dem Autoklavieren, soweit sie thermisch stabil sind, oder nach dem Autoklavieren durch Sterilfiltration, wo dies in Tab. 18 angegeben ist. Im Medium unlösliche Verbindungen wurden als Feststoffe nach dem Autoklavieren zugegeben. Die Pirson-Flaschen (750 ml) wurden in der unter 2.1.1.1 genannten Weise angeimpft und 5 Tage bei $27^{\circ}C$ gezogen. Die Bereitung des Rohextraktes geschah in der unter 2.1.1.2 beschriebenen Weise.

Im folgenden Text werden die häufig benutzen Verbindungen L- bzw. D-Cystein (L-Cys bzw. D-Cys), L-Cysteinmethylester (CME), L-Cysteinäthylester (CÄE), L-Homocystein (HCys), L-Serin (Ser), O-Acetyl-L-Serin (OAS), Phospho-L-Serin (PS), N-Acetyl-L-Serin (NAS) und reduziertes Glutathion (GSH) meist abgekürzt verwendet.

Wenn der Begriff "Hemmung" für niedrigere "Stimulierung" für höhere Enzymaktivitäten als die Sulfatkultur im Folgenden gebraucht wird, bedeutet dies keine Spezifizierung des Regulationsmechanismuses. Die vorliegenden Versuche können nicht zwischen dem Einfluß der Verbindungen über die Genaktivierung oder -hemmung, über die Proteinbiosynthese und den -abbau oder die Enzymaktivierung bzw. -inaktivierung unterscheiden.

Tab. 18 : Enzymregulation bei Chlorella unter Standardbedingungen

Schwefelverbindungen im Medium	S C Z	Chl.	SA	CS	SOS	L-CD	D-CD	TSR	GS	g.S.
Natriumsulfat Decahydrat $\bar{m}$		3,81	834	124	7,59	0,53	1,59	5,5	320	63
n = 93 σ		1,32	444	57	0,50	0,23	0,43	1,2	189	23
$\bar{m} + \sigma$		5,13	1278	181	1,09	0,79	2,02	6,7	509	86
		-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2,49	390	67	0,09	0,28	1,15	4,3	131	48
Schwefelmangel	-	0,04	349	644	8,73	4,87	1,65	38,9	80	957
Elementarer Schwefel	- U s	0,65	409	371	9,41	0,17	2,30	176,6	274	4365
S_o	+	3,26	1060	200	1,56	0,24	1,56	6,5	192	997
Eisensulfid	- M s	0,09	853	993	11,46	9,83	2,17	24,6	732	4965
FeS	+	4,68	741	82	1,82	f	f	f	172	f
Sulfaminsäure	- V	0,15	1724	476	2,77	f	f	3,4	124	453
NH_2SO_3H	+	4,71	905	59	0,73	f	f	f	186	f
Natriumsulfat Decahydrat	+ M	3,81	834	124	0,59	0,53	1,59	5,5	320	63
$Na_2SO_4 \times 10\ H_2O$										
Natriumthiosulfat	- M	2,49	743	197	1,12	0,51	1,80	6,3	297	158
$Na_2S_2O_3$	+	3,53	980	232	0,96	0,45	1,81	5,6	204	56
Natriumtetrathionat Dihydrat	- M s	2,70	1038	172	1,42	0,58	1,80	6,3	342	103
$Na_2S_4O_6 \times 2\ H_2O$										
Natriumthiocyanat	- M	0,29	1771	97	6,21	1,99	0,79	17,8	220	650
NaSCN										
Thioharnstoff	- S	0,31k	1958	123	2,80	f	f	9,9	432	103
$(NH_2)_2CS$										
Formamidinsulfinsäure	- S s	1,20	1707	231	2,80	0,59	1,84	14,6	872	112
$NH_2C(NH)SO_2H$	+	0,96k	1495	222	3,38	0,60	1,25	15,4	772	1434
Methansulfonsäure	- M d	1,19k	766	269	1,16	f	f	14,2	581	106
CH_3SO_3H	+	4,03	1237	142	0,75	f	f	8,1	408	107
Aminomethansulfonsäure	- F	k.W.	----	---	----	----	----	----	---	---
$NH_2CH_2SO_3H$	+	0,87	2181	62	1,38	f	f	f	364	f
Äthanthiol	- M	0,06	296	569	6,46	7,36	0,47	19,3	0	856
C_2H_5SH	+	2,10	701	186	0,58	0,47	1,92	5,1	272	58
Dimethylsulfid	- M	0,15	1378	227	5,30	3,14	1,58	28,6	254	694
$(CH_3)_2S$										
2-Mercaptoäthanol	- M	3,95	605	215	0,54	0,70	1,82	8,2	128	56
$HSCH_2CH_2OH$	+	5,21	1270	170	0,45	0,42	2,45	5,4	440	40
Thioessigsäure	- F	k.W.	----	---	----	----	----	----	---	---
CH_3COSH										
Thioglykolsäure	- F	4,96k	864	390	0,27	0,59	2,26	6,9	348	46
$HSCH_2COOH$	+	3,65	1226	267	0,65	0,44	2,22	3,4	352	50
Cysteamin	- S	1,45k	902	347	1,34	1,26	2,96	18,3	376	92
$NH_2CH_2CH_2SH$	+	2,63	2212	210	0,47	0,03	1,82	10,9	452	68
Thioacetamid	- E	2,73	1056	195	2,89	1,67	2,79	12,5	314	208
CH_3CSNH_2										
Dimethylsulfoxid (DMSO)	- M	0,12	446	207	f	3,18	1,34	44,3	90	387
$(CH_3)_2SO$	+	6,37	870	117	0,84	0,27	1,12	23,8	324	62

Tab. 18 : Fortsetzung 1

Schwefelverbindung im Medium	S C Z	Chl.	SA	CS	SCS	L-CD	D-CD	TSR	GS	g.S.
Dimethylsulfon	- M	0,43	2020	315	1,68	4,99	1,18	27,7	562	1155
$(CH_3)_2SO_2$	+	2,86	1396	33	2,16	f	f	f	172	f
Äthansulfonsäure	- M d	3,15k	1249	212	0,58	f	f	11,5	455	65
$C_2H_5SO_3H$	+	4,59	1130	115	0,29	f	f	5,7	456	79
Hydroxyäthansulfonsäure	- M d	3,61	1356	179	0,51	f	f	8,0	526	65
$HOCH_2CH_2SO_3H$	+	3,42	1324	182	0,42	f	f	5,1	422	76
Sulfoessigsäure	- K d	5,42	787	187	0,65	5,22	1,79	6,5	184	60
$HOOCCH_2SO_3H$	+	3,10	1301	112	0,95	0,63	2,09	5,1	622	66
Taurin	- S	4,46	1302	96	0,62	0,60	2,16	6,1	226	93
$NH_2CH_2CH_2SO_3H$	+	1,90	7773	54	0,56	f	f	f	282	f
2-Aminoäthylhydrogensulfat	- F d	0,28k	1580	354	3,02	f	f	22,3	400	107
$NH_2CH_2CH_2OSO_3H$	+	3,19	1390	80	0,28	f	f	8,1	148	61
1,2-Äthandithiol	- M	0,04	1673	384	2,42	4,94	3,44	2,0	132	2260
$HSCH_2CH_2SH$	+	0,38	319	250	1,86	1,41	1,74	9,7	680	202
2-Mercaptoäthansulfonsäure	- P	2,49k	1525	380	3,47	1,28	2,72	12,0	313	97
$HSCH_2CH_2SO_3H$	+	3,79	1194	228	1,78	0,52	1,46	7,9	720	81
1,2-Äthandisulfonsäure	- S	0,84k	1861	176	2,10	0,83	2,13	9,6	220	106
$HO_3SCH_2CH_2SO_3H$										
1-Propanthiol	- M	0,04	1528	839	4,54	4,83	1,58	10,8	376	279
$CH_3CH_2CH_2SH$										
1-Thioglycerin	- F	1,54	242	172	1,39	0,97	1,84	9,7	76	143
$HSCH_2CH(OH)CH_2OH$	+	4,26	617	114	1,56	0,66	1,41	5,3	180	40
3-Mercaptopropionsäure	- M	0,26	176	626	4,36	2,51	3,04	18,9	644	19
$HSCH_2CH_2COOH$	+	1,72	357	266	1,47	1,36	1,36	6,5	400	42
ß-Mercaptopyruvat	- F	2,87	1438	131	1,27	0,48	1,72	4,4	422	13
$HSCH_2COCOOH$	+	2,14	1287	139	1,94	0,37	1,83	4,7	390	0
L-Cystein	- M	4,53k	1139	120	2,49	0,54	1,36	6,1	270	56
$HSCH_2CH(NH_2)COOH$	+	5,16	855	107	0,53	0,46	1,86	5,4	268	39
D-Cystein	- M	3,14	514	227	0,85	0,25	1,33	9,8	244	59
$HSCH_2CH(NH_2)COOH$	+	4,56	1324	137	0,23	0,51	2,20	7,9	802	37
L-Cysteinsulfinsäure	- V	3,68	1740	113	2,48	0,48	1,65	4,9	220	78
$HO_2SCH_2CH(NH_2)COOH$	+	2,47	1495	107	2,10	0,56	2,19	6,7	456	185
Sulfopropionsäure	- K d	6,48	834	132	1,78	0,73	1,89	6,8	204	60
$HOOCCH_2CH_2SO_3H$	+	3,32	1137	82	1,07	0,51	2,01	5,2	281	67
L-Cysteinsäure	- V	4,19k	799	155	0,41	0,71	2,58	7,7	452	68
$HO_3SCH_2CH(NH_2)COOH$	+	3,87	974	94	0,33	0,58	2,09	4,9	352	102
3-Amino-1-propan-sulfonsäure	- S	3,53	952	96	0,87	0,78	2,58	11,6	486	101
$HO_3SCH_2CH_2CH_2NH_2$										
2,3-Dimercapto-1-propanol (BAL)	- M	k.W.	----	---	----	----	---	----	---	---
$HOCH_2CH(SH)CH_2SH$	+	k.W.	----	---	----	----	---	----	---	---
Methyl-methylthiomethyl-sulfoxid	- M	0,55	4398	914	4,29	1,86	1,43	7,7	864	287
$CH_3SOCH_2SCH_3$										
D/L-Homocystein	- S	1,10k	1129	273	2,06	0,78	1,94	10,6	190	91
$HSCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	+	2,05	766	205	1,45	0,57	1,82	6,2	147	78
L-Cysteinmethylester	- S	2,00k	1930	140	2,78	0,03	1,81	9,1	412	1989
$HSCH_2CH(NH_2)COOCH_3$	+	2,56	1494	105	1,09	0,13	2,16	8,7	692	49

Tab. 18 : Fortsetzung 2

Schwefelverbindung im Medium	S C Z	Chl.	SA	CS	SCS	L-CD	D-CD	TSR	GS	g.S.
S-Carbamoyl-L-Cystein $NH_2COSCH_2CH(NH_2)COOH$	- F	6,60	778	129	0,49	0,38	1,34	5,8	124	65
Methional $CH_3SCH_2CH_2CHO$ 3×10^{-5}M	- S	k.W.	----	---	----	----	----	----	---	---
S-Methyl-L-Cystein $CH_3SCH_2CH(NH_2)COOH$	- V +	3,07k 2,92	983 1125	262 380	1,08 0,67	0,81 0,51	0,97 1,09	10,5 8,2	317 448	74 70
2-(Äthylmercapto)äthanol $C_2H_5SCH_2CH_2OH$	- E	0,37	3925	385	3,64	1,29	6,86	6,9	796	140
Thiodiglykolsäure $S(CH_2COOH)_2$	- E	1,30k	2176	205	1,35	0,77	1,99	6,4	521	193
Tetrahydrothiophen $\overbrace{S(CH_3)_3CH_2}$	- F	0,05	1146	1190	4,93	0,77	6,89	10,1	1024	312
L-Thiazolidin-4-carbonsäure $\overbrace{CH_2SCH_2NHC}HCOOH$	- F	2,16	1052	194	0,85	0,61	2,23	9,5	251	70
D/L-Homocysteinthiolacton $\overbrace{SCH_2CH_2CH(NH_2)CO}$	- V	k.W.	----	---	----	----	----	----	----	---
S-Methylpropionsäuresulfoxid $CH_3SOCH_2CH_2COOH$	- K +	2,99k 3,86	719 1011	251 61	1,29 0,74	f f	f f	6,7 f	520 144	112 f
S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid $CH_3SOCH_2CH(NH_2)COOH$	- K	2,81	1030	193	1,27	0,75	1,87	12,8	104	106
2-Äthylmercaptoäthanolsulfoxid $CH_3CH_2SOCH_2CH_2OH$	- K d	0.20	4550	1050	1,69	1,55	0,93	6.2	764	161
2,2-Thiodiessigsäuresulfoxid $(HOOCCH_2)_2SO$	- K	3,25k	1109	71	1,25	0,39	1,82	3,9	114	103
2,2-Thiodiessigsäuresulfon $(HOOCCH_2)_2SO_2$	- K	2,71	1470	89	1,12	0,69	2,46	6,4	216	95
Sulfolan $\overbrace{CH_2(CH_2)_3SO_2}$	- F	0,10	3049	464	5,22	5,11	1,25	13,4	1164	766
D/L-Homocysteinsäure $HO_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	- S +	5,34k 1,89	613 374	164 222	0,25 0,76	0,46 0,46	1,68 2,21	7,7 8,1	284 288	61 58
1,4-Dithioerythritol (DTE) $HSCH_2CH(OH)CH(OH)CH_2SH$	- R +	3,51k 0,61	1464 797	226 275	2,11 1,85	0,35 0,72	2,85 1,97	9,6 6,2	368 452	53 399
Cystamin $NH_2CH_2CH_2SSCH_2CH_2NH_2$	- S	1,66	1333	210	1,44	0,78	2,61	15,0	548	120
L-Cysteinäthylester $HSCH_2CH(NH_2)COOC_2H_5$	- S +	1,10 1,64	2346 2179	109 113	1,27 4,95	0,04 0,37	1,79 1,66	8,2 8,7	388 698	3989 4775
N-Acetyl-L-Cystein $HSCH_2CH(NHCOCH_3)COOH$	- V +	1,55k 4,26	209 1014	242 181	0,68 0,37	1,42 0,37	1,57 1,82	11,6 6,2	96 324	70 66
α-Keto-γ-Methiolbutyrat $CH_3SCH_2CH_2COCOOH$	- S +	3,82 3,16	360 1055	243 85	2,59 2,20	0,51 0,82	1,79 2,97	5,8 5,2	192 470	120 0
L-Methioninol $CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)CH_2OH$	- F +	0,30 4,33	3240 1933	599 96	7,86 f	f f	f f	16,4 f	644 300	233 f
L-Methionin $CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	- M +	2,81 2,49	1715 1719	145 163	1,01 0,81	0,89 0,30	2,04 1,44	8,6 5,0	327 450	59 58
D-Methionin $CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	- F +	0,61k 1,55	2018 1642	281 154	2,45 0,86	1,92 0,63	2,04 1,39	13,4 6,2	301 444	150 55

Tab. 18 : Fortsetzung 3

Schwefelverbindung im Medium	S C Z	Chl.	SA	CS	SCS	L-CD	D-CD	TSR	GS	g.S.
L-Methioninamid $CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)CONH_2$	- S	3,62	1170	160	0,05	f	f	2,3	224	37
S-Äthyl-L-Cystein $C_2H_5SCH_2CH(NH_2)COOH$	- S s +	2,56 4,81	630 622	144 97	1,78 0,33	0,42 0,38	2,23 1,56	18,2 4,8	96 242	87 46
S-Carboxymethyl-L-Cystein $HOOCCH_2SCH_2CH(NH_2)COOH$	- F +	1,24 5,56	205 743	165 156	1,52 0,22	0,86 0,33	0,98 1,65	8,4 4,4	60 214	104 62
Tetrahydro-4H-thiopyran-4-on $SCH_2CH_2COCH_2CH_2$	- F s	0,22	3245	669	4,29	2,23	2,57	16,6	608	455
L-Methioninsulfoxid $CH_3SOCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	- S	3,80k	1375	229	1,05	0,83	1,96	7,8	256	102
L-Methioninsulfoximin $CH_3SO(NH)CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	- S +	0,05 0,20	1201 2933	238 184	4,92 0,43	2,53 f	2,53 f	19,1 f	92 108	308 f
L-Methioninsulfon $CH_3SO_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	- S s +	1,33k 2,30	2952 1439	152 153	2,56 0,78	f f	f f	28,0 6,2	1092 540	469 53
S-Methyl-D/L-Methionin $(CH_3)_2S(Cl)CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	- S +	0,91k 5,15	3681 609	647 105	6,72 4,94	f f	f f	16,5 6,0	1088 436	107 44
D/L-Äthionin $C_2H_5SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$ 1 x 10^{-5}M	- S +	k.W. k.W.	---- ----	--- ---	---- ----	---- ----	---- ----	---- ----	---- ----	--- ---
S-Carboxyäthyl-L-Cystein $HOOCCH_2CH_2SCH_2CH(NH_2)COOH$	- F +	1,28 5,40	80 804	153 173	0,54 0,21	0,75 0,66	1,20 1,21	6,3 5,9	56 256	119 46
D/L-meso-Lanthionin $HOOCCH(NH_2)CH_2SCH_2CH(NH_2)COOH$	- S s +	5,34k 8,24	451 867	170 119	0,78 0,26	0,43 0,36	1,83 1,67	8,5 4,4	236 376	161 32
L-Cystin $HOOCCH(NH_2)CH_2SSCH_2CH(NH_2)COOH$	- S s +	3,91k 6,32	985 1770	183 206	2,86 0,71	0,53 0,37	11,29 1,57	5,5 4,7	248 669	48 37
D-Cystin $HOOCCH(NH_2)CH_2SSCH_2CH(NH_2)COOH$	- S s +	2,32 2,81	898 1807	165 120	2,53 1,59	0,53 0,35	1,37 1,84	6,6 4,1	322 634	32 61
Benzolsulfinsäure $C_6H_5SO_2H$	- F	0,71	2835	425	0,79	11,58	2,25	11,1	632	180
Benzolsulfonamid $C_6H_5SO_2NH_2$	- F s	0,16	3203	888	1,01	21,07	7,95	63,5	612	2
Sulfanilamid $NH_2C_6H_5SO_2NH_2$	- V s +	k.W. k.W.	---- ----	--- ---	---- ----	----- -----	---- ----	---- ----	--- ---	--- ---
TES $(HOCH_2)CNHCH_2CH_2SO_3H$	- S +	0,73k 2,91	561 849	133 170	1,19 0,51	0,89 0,43	2,32 1,40	12,2 4,7	332 248	125 89
BES $(HOCH_2CH_2)NCH_2CH_2SO_3H$	- F +	2,26k 5,53	370 549	262 134	1,30 1,54	0,64 0,58	0,67 1,72	7,3 5,5	408 292	52 29
Benzolsulfonsäure $C_6H_5SO_3H$	- F	0,19	2377	639	1,11	4,44	2,71	20,4	724	400
Phenol-4-sulfonsäure $HOC_6H_5SO_3H$	- F	1,64k	2148	351	3,53	1,71	3,72	19,6	536	323
Sulfanilsäure $NH_2C_6H_4SO_3H$	- R s +	0,23k 2,97	2499 884	565 231	4,50 0,39	4,36 0,44	4,06 2,36	36,6 4,1	520 406	416 57
Orthanilsäure $NH_2C_6H_4SO_3H$	- F s +	0,16 3,53	5078 776	979 84	6,99 0,72	2,63 f	1,77 f	18,2 f	768 132	236 f
MES $CH_2CH_2OCH_2CH_2NCH_2CH_2SO_3H$	- S	0,34	1189	598	1,10	0,78	1,98	6,9	669	79

Tab. 18 : Fortsetzung 4

Schwefelverbindung im Medium	S C Z	Chl.	SA	CS	SCS	L-CD	D-CD	TSR	GS	g.S.
D/L,D/L-allo-Cystathionin $HOOCCH(NH_2)CH_2SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$	- S s +	1,15 1,70	127 112	138 243	1,63 1,12	1,49 0,87	1,15 1,62	9,9 10,0	50 448	104 103
p-Thiocresol $CH_3C_6H_4SH$	- F s	k.W.	----	---	----	----	----	----	---	---
Thiosalicylsäure HSC_6H_4COOH	- V s +	1,98 0,99	1232 994	350 189	0,75 0,75	1,01 0,49	3,22 0,83	13,5 6,6	372 476	135 103
Toluol-4-sulfinsäure $CH_3C_6H_4SO_2H$	- F	2,13k	1120	114	1,06	0,70	2,35	5,9	184	82
TAPS $(HOCH_2)_3CNHCH_2CH_2CH_2SO_3H$	- S +	3,40k 3,42	467 901	183 151	0,27 0,02	0,39 0,29	1,72 1,50	7,6 4,2	304 374	80 60
TAPSO $(HOCH_2)_3CNHCH_2CH(OH)CH_2SO_3H$	- V	4,11	651	209	0,91	0,74	3,15	7,4	304	146
DIPSO $(HOCH_2CH_2)_2NCH_2CH(OH)CH_2SO_3H$	- V	1,46	122	335	2,24	1,5	3,69	10,1	440	121
MOPS $CH_2CH_2OCH_2CH_2NCH_2CH_2CH_2SO_3H$	- S	0,86k	2544	169	1,09	0,69	2,53	6,9	516	67
MOPSO $CH_2CH_2OCH_2CH_2NCH_2CH(OH)CH_2SO_3H$	- V	2,52	566	241	1,52	0,94	1,14	9,5	348	101
Toluol-4-sulfonsäure Monohydrat $CH_3C_6H_4SO_3H \times H_2O$	- M	0,43	107	233	4,42	1,97	3,80	15,7	252	242
S-Sulfosalicylsäure $HOC_6H_3(COOH)SO_3H$	- M +	0,74 2,21	411 685	465 136	1,54 0,11	1,27 0,48	4,18 2,78	22,4 5,9	280 216	181 62
L-Djenkolsäure $CH_2(SCH_2CH(NH_2)COOH)_2$	- S s +	0,15 3,18	167 362	135 114	1,53 0,67	1,93 0,40	2,22 1,32	17,6 3,4	56 264	180 10
L-Homocystin $HOOCCH(NH_2)CH_2CH_2SSCH_2CH_2-$ $CH(NH_2)COOH$	- S s +	3,87 3,18	460 690	128 184	1,29 0,54	0,42 0,35	1,36 2,87	9,4 6,7	116 220	52 57
D-Homocystin $HOOCCH(NH_2)CH_2CH_2SSCH_2CH_2-$ $CH(NH_2)COOH$	- S s +	0,34 2,73	472 509	506 197	9,56 0,75	2,46 0,49	2,99 2,13	28,6 8,1	272 244	114 92
HEPES $CH_2CH_2N(CH_2CH_2SO_3H)CH_2CH_2NCH_2CH_2OH$	- V	0,87k	3013	275	1,95	0,95	2,59	7,1	656	106
α-Liponsäureamid $SSCH_2CH_2CH(CH_2)_4CONH_2$	- V s +	2,54 2,93	1636 1508	129 130	1,97 2,13	0,43 0,66	2,23 1,23	13,0 5,1	308 336	767 292
HEPSO $CH_2CH_2N(CH_2CH_2SO_3H)CH_2CH_2NCH_2-$ $-CH(OH)CH_2OH$	- V	1,47	290	289	2,48	1,22	4,24	11,1	408	108
Sulfathiazol $SCHCHNCNHSO_2C_6H_4NH_2$	- V s	k.W.	----	---	----	----	----	----	---	---
L-Cystindiäthylester $C_2H_5OOCCH(NH_2)CH_2SSCH_2CH(NH_2)-$ $COOC_2H_5$	- I s +	0,17 0,08	1974 1569	156 209	31,57 66,03	0,00 0,00	3,59 0,00	9,5 11,1	168 357	1576 3003
S-Benzyl-L-Cystein $C_6H_5CH_2SCH_2CH(NH_2)COOH$	- F +	0,53 2,57	937 868	363 191	2,01 0,91	2,49 0,46	2,3 1,89	27,3 6,6	122 260	125 56
D(+)-Biotin $C_6H_5CH_2SCH_2CH(NH_2)COOH$	- S s +	0,20 2,16	375 487	274 336	1,76 0,53	2,70 0,88	0,72 1,63	25,5 9,5	72 456	205 120

Tab. 18 : Fortsetzung 5

Schwefelverbindung im Medium	S C Z	Chl.	SA	CS	SCS	L-CD	D-CD	TSR	GS	g.S.
POPSO $CH_2CH_2N(CH_2CH(OH)CH_2SO_3H)CH_2CH_2N-$ $-CH_2CH(OH)CH_2SO_3H$	- V s	3,70k	587	24	1,01	0,79	2,28	6,8	368	87
Thiamindichlorid $CH_3C:C(CH_2CH_2OH)SCH:N(Cl)-$ $-CH_2C:CHN:C(CH_2)N:CNH_2$ x HCl	- M	0,23	4611	528	2,28	f	f	20,5	608	156
Natriumdodecylsulfat (SDS) $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	- V +	0,60 1,17	2876 1588	298 166	1,09 0,79	f f	f f	14,6 f	620 524	80 f
DTNB $HOOCC_6H_3(NO_2)SSC_6H_3(NO_2)COOH$	- S	0,85	1702	328	1,25	1,07	1,42	8,8	432	84
Sulfobetain $CH_3(CH_2)_{11}N(CH_3)_2CH_2CH_2CH_2SO_3H$	- V	k.W.	----	---	----	---	---	----	---	---
Glutathion reduziert (GSH) $HOOCCH(NH_2)(CH_2)_2CONHCH(CH_2SH)-$ $-CONHCH_2COOH$	- M +	2,25k 1,55	550 525	252 187	1,06 0,85	0,82 0,59	1,76 1,57	10,1 9,0	166 292	57 100
Glutathiosulfonsaure $HOOCCH(NH_2)(CH_2)_2CONHCH(CH_2SO_2)-$ $-CONHCH_2COOH$	- M	0,36	2464	134	2,92	2,93	3,17	12,2	408	135
Glutathion oxidiert (GSSG) $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$	- B +	0,54k 6,64	985 763	430 68	2,39 0,68	0,73 f	1,22 f	7,2 f	512 312	162 f
Ligninsulfonsäure	- R s +	2,81k 3,23	1327 955	241 153	0,51 0,67	0,69 0,39	1,75 1,66	6,5 5,3	360 188	65 51

Abkürzungen :

S = Sulfatzusatz (-) = ohne Sulfatzusatz, (+) = mit Sulfatzusatz (2×10^{-4}M);

C = Hersteller : B = Boehringer, Mannheim; E = EGA-Chemie, Steinheim; F = Fluka AG, Buchs, Schweiz; H = Riedel-de-Haen, Seelze-Hannover; K = Synthese von Dr. H.-P. Köst nach 2.8.3.3 - 2.8.3.5, Botanisches Institut , Universität München,; M = Merck, Darmstadt; P = Pierce Eurochemie, Rotterdam, Holland; R = Roth, Karlsruhe; S = Sigma, St. Louis, USA; V = Serva, Heidelberg

Z = Zugabe : s = fest nach dem Autoklavieren, d = Sulfatfrei mit Bariumacetat und Dowex 1 x 50 (2.8.1);

Chl. = Chlorophyll (mg x 750 ml Medium^{-1}; SA = Sulfataktivierung (nmol (^{35}S)-Sulfit x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1});

CS = Cysteinsynthase (µmol Cystein x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); SCS = S-Sulfocysteinsynthase (µmol "Cystein" x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); L-CD = L-Cysteindesulfhydrase (µmol Schwefelwasserstoff x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1});

D-CD = D-Cysteindesulfhydrase (µmol Schwefelwasserstoff x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); TSR = Thiosulfatreduktase (µmol Schwefelwasserstoff x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); GS = Glutaminsynthetase (µmol umgesetztes Glutamin x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); g.S. = gebundenes Sulfid (nmol Schwefelwasserstoff x mg Chl.$^{-1}$).

Schwefelmangel = Medium ohne Sulfatzusatz (2.1.1.1); TES = N-(Tris(hydroxymethyl)methyl)-2-aminoäthansulfonsäure; BES = N,N-Bis(2-hydroxyäthyl)-2-aminoäthansulfonsäure; MES = 2-Morpholino-äthansulfonsäure; TAPS = N-(Tris(hydroxymethyl)methyl)-3-aminopropansulfonsäure; TAPSO = N-(Tris(hydroxymethyl)methyl)-3-amino-2-hydroxy-propansulfonsäure; DIPSO = N,N-Bis(3-hydroxyäthyl)-3-amino-2-hydroxy-propansulfonsäure; MOPS = 3-Morpholino-propansulfonsäure; MOPSO = 3-Morpholino-2-hydroxy-propansulfonsäure; HEPES = 4-(3-Hydroxyäthyl)piperazin-1-äthan-2-sulfonsäure; HEPSO = 4-(3-Hydroxyäthyl)piperazin-1-2-hydroxy-propan-3-sulfonsäure; POPSO = Piperazin-4,1'-bis(2-hydroxy-propansulfonsäure); DTNB = 5,5'-Dithio-bis(2-nitro-benzoesäure) (3,3'-6); Sulfobetain = N-Dodecyl-N,N'-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonsäure; Ligninsulfonsäure = Gemisch von Ligninsulfonsäuren unterschiedlichen Polymerisierungsgrades.

Tab. 19 : Enzymregulation bei Synechococcus 6301 unter Standardbedingungen

Schwefelverbindung im Medium	S	Chl.	SA	CS	SCS	ISR	GS	g.S.
Natriumsulfat Decahydrat $\bar{m}$		1,35	127,5	12,0	0,45	3,72	1975	123
n = 33 σ		0,63	54,5	7,7	0,32	2,14	639	55
$\bar{m} \pm \sigma$		1,98	181,8	19,7	0,77	5,86	2614	178
		-	-	-	-	-	-	-
		0,72	73,3	4,3	0,13	1,48	1336	68
Schwefelmangel	-	0,16	64,0	64,8	0,72	3,61	953	74
Elementarer Schwefel	-	1,22	209,5	f	f	f	1284	4186
Eisensulfid	-	0,23	71,5	f	f	f	768	260
Sulfaminsäure	-	0,19	78,5	25,6	1,74	f	636	f
Natriumsulfat Decahydrat	-	1,35	127,5	12,0	0,45	3,72	1975	123
Natriumthiosulfat	-	0,79	163,8	20,4	0,65	f	1814	108
Natriumtetrathionat	-	0,44	85,5	22,0	0,67	f	1420	83
Natriumthiocyanat	-	0,66	176,8	44,2	0,49	2,90	2429	142
Formamidinsulfinsäure	-	k.W.	-----	----	----	----	----	---
Methansulfonsäure	-	k.W.	-----	----	----	----	----	---
Äthanthiol	-	k.W.	-----	----	----	----	----	---
Dimethylsulfid	-	0,13	43,0	35,4	5,51	6,11	1224	198
2-Mercaptoäthanol	-	0,19	22,0	16,8	0,62	f	896	168
Thioessigsäure	-	0,93	141,5	f	f	f	3336	143
Thioglykolsäure	-	0,82	75,1	13,2	0,34	f	2296	124
Cysteamin	-	k.W.	-----	----	----	----	----	---
Thioacetamid	-	1,58	212,7	14,9	0,47	f	1858	351
Dimethylsulfoxid (DMSO)	-	0,14	83,8	28,8	0,67	f	1016	f
Dimethylsulfon	-	k.W.	-----	----	----	----	----	---
Äthansulfonsäure	-	0,36	31,0	30,6	f	f	708	70
Hydroxyäthansulfonsäure	-	0,21	21,0	27,0	1,12	f	668	894
	+	1,62	122,1	2,7	0,70	f	2808	f
Sulfoessigsäure	-	0,19	30,5	30,6	0,27	f	740	179
	+	2,34	192,0	4,6	0,26	f	3080	f
Taurin	-	0,19	75,5	10,5	4,10	f	1044	68
	+	1,37	123,2	7,3	0,42	f	1936	f
2-Aminoäthylhydrogensulfat	-	0,46	113,5	30,4	f	f	980	f
1,2-Äthandithiol	-	k.W.	-----	----	----	----	----	---
2-Mercaptoäthansulfonsäure	-	0,24	14,0	42,4	1,51	f	824	214
1-Propanthiol	-	k.W.	-----	----	----	----	----	---
ß-Mercaptopyruvat	-	0,87	56,0	17,1	1,88	0,96	585	178
	+	0,52	91,0	29,5	0,00	1,47	1110	164
L-Cystein	-	1,08	135,0	25,8	f	f	1432	f
	+	0,36	98,0	9,8	f	f	1236	f
D-Cystein	-	0,88	59,0	25,2	f	f	784	f
	+	0,63	163,1	14,6	f	f	332	f

Tab. 19 : Fortsetzung 1

Schwefelverbindung im Medium	S	Chl.	SA	CS	SCS	TSR	GS	g.S.
L-Cysteinsäure	-	0,25	88,0	37,4	0,70	f	1144	71
	+	0,51	243,0	15,6	2,74	f	2384	f
3-Amino-1-propan-sulfonsäure	-	0,21	167,5	23,6	11,66	f	1178	89
	+	0,96	193,0	10,0	3,57	f	2296	f
2,3-Dimercapto-1-propanol (BAL)	-	0,48	41,0	17,2	0,42	1,79	1679	69
Methyl-methylthiomethylsulfoxid	-	0,18	85,0	13,0	f	f	998	f
D/L-Homocystein	-	0,52	15,0	25,6	0,09	1,56	860	144
	+	0,98	40,0	14,7	0,05	0,86	682	64
L-Cysteinmethylester	-	k.W.	----	----	----	----	---	---
	+	0,55	53,0	15,3	0,21	f	1096	f
Methional	-	k.W.	----	----	----	----	----	---
	+	k.W.	----	----	----	----	----	---
S-Methyl-L-Cystein	-	0,39	49,5	f	f	f	1024	f
	+	1,27	79,0	f	f	f	2980	f
2-Äthylmercaptoäthanol	-	0,12	171,0	44,2	f	f	1212	f
Thiodiglykolsäure	-	0,42	106,9	26,2	1,63	f	2692	181
L-Thiazolidin-4-carbonsäure	-	0,56	79,0	20,5	f	4,01	1186	124
S-Methylpropionsäuresulfoxid	-	0,28	f	25,4	f	f	864	f
2-Äthylmercaptoäthanolsulfoxid	-	0,12	95,5	42,0	f	f	1192	f
2,2-Thiodiessigsäuresulfoxid	-	0,50	98,5	18,2	0,77	f	2892	258
2,2-Thiodiessigsäuresulfon	-	0,64	96,0	24,2	0,43	f	2360	165
1,4-Dithioerythritol (DTE)	-	0,29	22,2	19,5	0,61	1,92	877	121
	+	0,35	37,5	11,9	0,31	1,45	750	85
Cystamin	-	k.W.	----	----	----	----	---	---
	+	k.W.	----	----	----	----	---	---
L-Cysteinäthylester	-	k.W.	----	----	----	----	---	---
	+	0,26	21,0	13,9	0,56	f	596	f
N-Acetyl-L-Cystein	-	0,41	63,7	35,2	0,38	2,94	832	83
L-Methionin	-	0,32	27,7	69,4	0,43	12,90	963	241
	+	0,97	48,4	24,0	0,08	2,07	1118	111
D-Methionin	-	0,24	30,0	67,7	0,48	2,87	787	151
	+	0,56	71,9	36,1	0,08	2,35	1689	116
α-Keto-γ-Methiolbutyrat	-	0,21	8,7	74,0	0.00	0,96	676	70
	+	6,57	278,3	14,3	0,18	1,25	1018	315
L-Methioninamid	-	0,30	123,0	60,4	3,26	f	2168	833
S-Äthyl-L-Cystein	-	0,17	34,8	32,7	1,78	2,87	787	151
	+	0,77	92,7	11,1	0,17	2,25	365	64
L-Methioninsulfoxid	-	0,22	265,0	31,8	9,57	f	870	f
	+	0,81	148,0	25,1	4,20	f	3356	126
L-Methioninsulfoximin	-	k.W.	-----	----	----	----	----	---
	+	k.W.	-----	----	----	----	----	---
L-Methioninsulfon	-	0,29	56,0	33,4	6,41	3,95	1352	145
	+	0,72	153,0	26,4	3,98	4,01	2880	360
S-Methyl-D/L-Methionin	-	0,03	f	59,0	4,56	f	1076	f
D/L-Äthionin	-	0,11	81,5	41,2	2,18	0,98	1864	250

Tab. 19 : Fortsetzung 2

Schwefelverbindung im Medium	S	Chl.	SA	CS	SCS	TSR	GS	g.S.
D/L-meso-Lanthionin	-	0,15	59,0	40,0	1,29	f	824	147
L-Cystin	-	0,66	100,1	34,9	0,13	4,58	970	304
	+	0,59	56,0	20,4	0,06	1,78	1079	116
D-Cystin	-	0,24	122,2	35,1	0,14	14,44	1869	406
	+	3,24	69,5	17,1	0,06	1,69	678	103
Benzolsulfinsäure	-	0,57	44,5	24,0	3,56	4,87	1852	123
Sulfanilamid	-	k.W.	----	----	----	----	----	---
	+	0,07	f	17,1	f	f	1684	f
TES	-	0,17	f	40,4	15,90	f	1272	344
Benzolsulfonsäure	-	0,13	29,0	4,7	f	16,50	976	209
Phenol-4-sulfonsäure	-	0,98	103,5	19,5	0,55	3,43	1724	87
Sulfanilsäure	-	0,07	97,5	37,0	f	20,55	1752	490
	+	0,08	f	f	2,12	f	1816	f
Orthanilsäure	-	0,11	51,0	29,4	2,44	12,23	1284	117
Thiosalicylsäure	-	0,22	40,0	46,5	3,13	7,79	744	166
	+	0,99	457,0	189,0	0,75	f	856	f
Toluol-4-sulfinsäure	-	0,80	110,0	19,8	0,31	4,01	1852	111
TAPS	-	0,17	72,4	36,5	0,57	6,74	1192	805
Toluol-4-sulfonsäure Monohydrat	-	0,19	57,5	40,6	1,12	0,86	934	98
S-Sulfosalicylsäure	-	0,39	20,0	24,8	3,00	11,45	516	532
L-Djenkolsäure	-	1,38	98,0	10,8	3,40	f	1904	f
	+	3,18	41,0	7,0	0,74	f	2024	f
L-Homocystin	-	0,41	57,5	37,8	0,66	f	2090	177
	+	1,94	93,5	8,3	0,46	2,44	1708	71
D-Homocystin	-	0,49	63,0	35,2	0,78	f	1364	424
	+	1,12	54,0	9,6	0,21	1,49	1564	72
α-Liponsäureamid	-	0,76	87,8	21,4	0,42	1,45	1208	135
	+	0,91	95,5	10,6	f	2,19	1284	144
Sulfathiazol	-	k.W.	----	----	----	----	----	---
L-Cystindiäthylester	-	k.W.	----	----	----	----	----	---
	+	k.W.	----	----	----	----	----	---
D(+)-Biotin	-	0,46	59,0	34,0	0,86	f	504	53
Glutathion reduziert (GSH)	-	4,79	97,0	10,3	1,66	f	2372	f
	+	1,42	147,0	51,9	2,07	f	1923	f
Glutathionsulfonsäure	-	k.W.	-----	----	----	-----	----	---
Ligninsulfonsäure	-	1,05	38,5	11,0	0,71	2,86	1067	84

Einheiten der Enzymaktivitäten :

Chl. = Chlorophyll (mg x 750 ml Medium^{-1});
SA = Sulfataktivierung (nmol (^{35}S)-Sulfit x mg Chlorophyll^{-1} x Stunde^{-1});
CS = Cysteinsynthase (µmol Cystein x mg Chlorophyll^{-1} x Stunde^{-1});
SCS = S-Sulfocysteinsynthase (µmol "Cystein" x mg Chlorophyll^{-1} x Stunde^{-1});
TSR = Thiosulfatreduktase (µmol Schwefelwasserstoff x mg Chlorophyll^{-1} x Stunde^{-1});
GS = Glutathionsynthetase (µmol umgesetztes Glutamin x mg Chlorophyll^{-1} x Stunde^{-1});
g.S. = gebundenes Sulfid (nmol Schwefelwasserstoff x mg Chlorophyll^{-1}).

Abkürzungen, chemische Formeln, Herkunft und Einsatz der Verbindungen wie in Tab. 18.

3.4.2.1 Wachstum

Als Maßstab für ein Wachstum wurde bei diesen Untersuchungen die Gesamtmenge an Chlorophyll herangezogen, die eine Kultur in 750 ml Medium während 5 Tagen bildet.

3.4.2.1.1 Wachstum von Chlorella

Betrachtet man die in Tab. 18 dargestellten Ergebnisse, so fällt auf, daß Chlorella eine erstaunlich große Vielfalt von schwefelhaltigen Verbindungen als S-Quelle zum Wachstum verwenden kann. Chlorella ist in der Lage, auf anorganischen schwefelhaltigen Salzen, wie auf Mercaptiden, Thioäthern, Sulfatestern, Sulfin- und Sulfonsäuren zu wachsen. Dabei sind besonders so Umwelt-relevante Substanzen, wie Ligninsulfonsäure, Waschmitteldetergentien (Ergebnisse nur zum Teil gezeigt) und Alkylbenzol-sulfonsäure (LAS), die in großen Mengen bei der industriellen Produktion anfallen von Bedeutung. Chlorella wäre somit zur Klärung von Abwässern bestimmter Produktionszweige geeignet, wie z.B. der Papierindustrie, bei der die schwer abbaubare Ligninsulfonsäure bei der Holzbleichung anfällt. Aber auch die Klärung von Detergentien aus Industrie und Haushalt ist möglich.
Beim Wachstum auf Sulfat wird 2,5 - 5 mg Chlorophyll in einer Kultur gebildet, was einer Proteinmenge von bis zu 60 mg entspricht. Trotzallem gibt es einige Verbindungen, die kein Wachstum ermöglichen. Dabei wird keine Zunahme der Algenmasse, als Frischgewicht bestimmt, nach dem Animpfen beobachtet. Dies kann sowohl für Aldehyde, wie Methional und auch für Aromaten, so Sulfanilamid, Sulfathiazol oder Thiokresol, beobachtet werden. Prinzipiell scheinen Mercaptide in den meisten Fällen das Wachstum zu erschweren, wie dies bei Alkylthiolen, wie Äthanthiol, Äthandithiol oder Propanthiol der Fall ist.
Das Dithiol Dimercaptopropanol (BAL) hemmt das Wachstum auch in Gegenwart von Sulfat vollständig. Ein geringes Wachstum wird auch für Mercaptopropionsäure verzeichnet, wohingegen eine Oxidation der Thiolgruppe, in diesem Falle zu Sulfopropionsäure, zu stark vermehrtem Wachstum führt.
Es ist interessant zu sehen, daß eine teilweise Oxidation des schlecht verwertbaren Äthandithiols zu Mercaptoäthansulfonsäure normale Werte, eine totale Oxidation zu Äthandisulfonat wieder schlechtes Wachstum bewirkt. Der Austausch einer Thiolgruppe und die Verkürzung der Kohlenstoffkette der Mercaptoäthansulfonsäure durch eine Aminogruppe zu Aminomethansulfonsäure hemmt die Algen vollständig. Dimethylsulfid und Dimethylsulfoxid können ebenso schlecht wie Sulfatester, wie SDS und 2-Aminoäthanhydrogensulfat, und Aromaten, wie Benzolsulfonsäure oder Phenol-4-sulfonsäure und "Good" Puffer, wie HEPES oder MES,

verwertet werden. Hervorzuheben ist noch, daß D/L-HCys und D-HCys eine schlechte S-Quelle im Gegensatz zu L-Homocysteinsäure sind. Auch D-Cystin kann im Gegensatz zu L-Cystin nur schlecht verwertet werden. Äthionin, sogar mit Sulfatzusatz, erlaubt im Gegensatz zu Methionin, das nur um eine CH_2-Gruppe kürzer ist und ein normales Wachstum aufweist, keine Zellmassenvermehrung.
Der Sulfatzusatz zu diesen schlechten S-Quellen führt in allen bisher nicht genannten Fällen, soweit überhaupt bestimmt, zu normalem Wachstum (Tab. 18).
Ein gegenteiliger Effekt kann für die Verbindungen beobachtet werden, die allein ein sehr gutes Wachstum bewirken. Dabei handelt es sich um das Paar Sulfoessig- und Sulfopropionsäure, sowie L-Homocysteinsäure, Lanthionin und S-Carbamoyl-L-Cystein.

3.4.2.1.2 Wachstum bei Synechococcus

Vergleicht man die in Tab. 19 dargestellten Ergebnise mit denen von Chlorella (Tab. 18), so fällt auf, daß diese Blaualge nur einen Teil der Verbindungen metabolisieren und zum Wachstum verwerten kann.
Kein Wachstum tritt bei Dimethylsulfon, Äthanthiol, Propanthiol, Sulfathiazol, Cysteamin, Cystamin, Methional, Methioninsulfoximin, Formamidinsulfinsäure, Methansulfonsäure, Aminomethansulfonsäure, Glutathionsulfonsäure sowie bei den beiden Cysteinestern auf, die auch bei Sulfatzugabe nur ein geringes Wachstum erlauben.
Ein erniedrigtes Wachstum kann für S-Mangel, Eisensulfid, Thiocyanat und Tetrathionat wie für den Sulfatester und Mercaptide, wie Mercaptoäthanol, DTE oder BAL, beobachtet werden. Thioäther führen prinzipiell zu niedrigem Wachstum, wie dies bei L-Methionin,Äthionin oder S-Methyl- oder S-Äthylcystein auftritt. Die meisten Sulfin- und Sulfonsäuren sowie Sulfone und Sulfoxide hemmen das Wachstum stark.
Synechococcus wächst auf Thiosulfat, Mercaptoessigsäure, Thioessigsäure, L-Cystein und L-Cystin genauso gut wie auf Sulfat. Nur Glutathion fördert das Wachstum.

3.4.2.2 Sulfataktivierung

Die Summenaktivität der Sulfataktivierung, die sich aus ATP-Sulfurylase und APS-Sulfotransferase zusammensetzt,wurde mit je 100µl Rohextrakt im Test 2.5.6 bei Chlorella und Synechococcus gemessen.

3.4.2.2.1 Sulfataktivierung bei Chlorella

Das Verhalten der Sulfataktivierung kann bei Chlorella in 4 Gruppen eingeteilt werden :

1. Die größte Gruppe besteht aus Verbindungen, die bei geringem Wachstum zu teils drastisch erhöhten Enzymaktivitäten führen und S-Mangelbedingungen andeuten. Dies trifft auf Mercaptide, wie Äthanthiol und Propanthiol, Dithiole, wie Cystindiäthylester, Thioäther, wie Dimethylsulfid, 2-Äthylmercaptoäthanol und Thiodiglycolsäure, Sulfatester, wie 2-Aminomethylhydrogensulfat und SDS, "Good" Puffer, wie HEPES und MOPS, sowie auf Sulfin- und Sulfonsäurem zu, wobei hier Benzolsulfinsäure, Benzolsulfonsäure und Glutathionsulfonsäure als Beispiele erwähnt werden sollen.
Der Zusatz von Sulfat führt zu unterschiedlichen Reaktionen (Tab. 18). Sulfanilsäure, Orthanilsäure und Sulfaminsäure, alle strukturell durch eine Aminogruppe und Sulfongruppe ähnlich, zeigen ein normales Wachstum und normale Sulfataktivierung. Dimethylsulfon, Propanthiol, Methioninol und Cysteinsulfinsäure weisen bei normalem Wachstum immer noch erhöhte Enzymaktivitäten auf. Bei Formamidinsulfinsäure, Aminomethansulfonsäure, Cystindiäthylester, Methioninsulfon und SDS kann Sulfat keinen Einfluß bewirken. Äthanthiol hemmt in Sulfatmedium sogar nicht nur das Wachstum, sondern auch die Sulfataktivierung.

2. Bei dieser Gruppe ist die Sulfataktivierung trotz normalem Wachstum deutlich erhöht. Es handelt sich um DTE, L-Cysteinmethylester, L-Methionin, Methioninsulfoximin, Cysteinsulfinsäure, sowie die Sulfonsäuren, Hydroxyäthansulfonsäure, Mercaptoäthansulfonsäure, Taurin und Thiodiessigsäuresulfon.
Der Zusatz von Sulfat kann neben normalem Wachstum auch zu normaler Sulfataktivierung bei L-CME und Mercaptoäthansulfonsäure führen. Bei Hydroxyäthansulfonsäure, L-Methionin und Liponsäureamid wird die Sulfataktivierung erhöht.
Taurin und DTE dagegen hemmen in Gegenwart von Sulfat das Wachstum bei normaler Sulfataktivierung.

3. Diese Verbindungen zeigen neben einem schlechten Wachstum geringe Enzymaktivitäten, wie dies schon für die S-Mangelkultur beobachtet wurde (3.4.1.1). Dabei handelt es sich um Mercaptide, wie Äthanthiol, Mercaptopropionsäure, N-Acetyl-L-Cystein, S-Carboxymethyl-L-Cystein, S-Carboxyäthyl-L-Cystein, D-Cystin und Cystathionin und Djenkolsäure, sowie die "Good"- Puffer BES, HEPSO und DIPSO. Die Zugabe von Sulfat führt bei Äthanthiol zu normalen Enzymwerten, während Mercaptopropionsäure und Djenkolsäure normales Wachstum

bei niedriger Sulfataktivierung zeigen. S-Carboxymethyl- und S-Carboxyäthyl-L-Cystein bewirken bei sehr gutem Wachstum normale Enzymwerte. Cystathionin hemmt auch im Sulfatmedium Wachstum und Sulfataktivierung.

4. Thioglycerin zeigt bei normalem Wachstum niedrige Sulfataktivierung, die aber durch Sulfat wieder normalisiert werden kann.

3.4.2.2.2 Sulfataktivierung bei Synechococcus

Das Verhalten der Blaualge kann in 6 Gruppen eingeteilt werden :

1. Diese Hauptgruppe, die das gleiche Verhalten wie S-Mangel aufweist, zeigt bei geringem Wachstum niedrige Sulfataktivierung . Dabei sind Mercaptide, wie ME, DTE oder BAL, Thioäther, wie Dimethylsulfid oder L- und D-Methionin, Sulfinsäuren , wie Benzolsulfinsäure, und eine Anzahl von Sulfonsäuren zu nennen, zu denen aliphatische und aromatische Sulfonsäuren gehören. Sulfatzugabe führt bei S-Äthyl-L-Cystein, Hydroxyäthansulfonsäure und Thiosalicylsäure zu normalem Wachstum und normaler Enzymaktivität. Nur bei DTE tritt trotz geringem Wachstum ein normaler Enzymwert auf, während D-Homocystin ein erhöhtes Wachstum zeigt. Sulfoessigsäure weist unter diesen Bedingungen erhöhtes Wachstum und höhere Enzymaktivität auf. L-Methionin sowie D/L-Homocystein hemmen trotz normalen Wachstums das Enzym. Bei D-Methionin führt Sulfatzugabe zu keiner Änderung.

2. Trotz geringem Wachstum tritt bei Thiocyanat, Tetrathionat, L- und D-Cystin L-Methionin, Äthionin, Toluolsulfinsäure, DMSO und einige Sulfonsäuren wie L-Cysteinsäure, Taurin oder 3-Amino-1-propansulfonsäure normale Enzymaktivität auf. Sulfatzugabe bewirkt bei L-Methionin und 3-Amino-1-propansulfonsäure normales Wachstum und erhöhte Enzymaktivität. Nur Taurin normalisiert beide Werte, während L-Cysteinsäure trotz geringem Wachstums erhöhte Sulfataktivierung zeigt. L-Cystin führt zu geringem Wachstum und niedriger Aktivität, wohingegen D-Cystin trotz gutem Wachstum gehemmte Enzymaktivität besitzt.

3. Methioninsulfoxid weist bei schlechtem Wachstum eine erhöhte Aktivität auf, die durch Sulfatzugabe normalisiert wird.

4. Normales Wachstum mit erniedrigtem Enzym treten bei D-Cys, Mercaptopyruvat und Ligninsulfonsäure auf, wobei Sulfatzugabe das Wachstum bei D-Cys und Mercaptopyruvat hemmt und normale Sulfataktivierung beobachtet wird.

5. Thioacetamid weist erhöhte Enzymaktivität bei normalem Wachstum auf.

6. Glutathion führt zu erhöhtem Wachstum bei normalem Enzymwert, der durch Sulfatzugabe normal wird.

3.4.2.3 Cysteinsynthase

Die Cysteinsynthase, wurde nach dem Test 2.5.1 mit 100µl Rohextrakt (2.1.1.2) gemessen. Bei Chlorella war es nötig, den Rohextrakt 1/10 mit 20 mM Tris-HCl pH 7,5 vorzuverdünnen, um die Substratumsätze wegen der hohen Enzymaktivität im Eichbereich zu halten. Außerdem mußte man stets einen Nullwert ohne OAS bestimmen, da interne Cysteingehalte, auf die noch unter 3.6 eingegangen werden soll, bei der Berechnung der Cysteinsynthaseaktivität abgezogen werden müssen.

3.4.2.3.1 Cysteinsynthase bei Chlorella

Das Verhalten des Enzyms bei Chlorella kann in 5 Gruppen eingeteilt werden :

1. Die Hauptgruppe der Verbindungen zeigt bei geringem Wachstum stark erhöhte Enzymumsätze, wie diese von der S-Mangelkultur her bekannt sind (3.4.1.1).

Da ein Großteil der geprüften Substanzen dieses Verhalten zeigen, sollen nur einige Stoffgruppen mit typischem Vertreter genannt werden. Dazu sind elementarer Schwefel und Eisensulfid zu nennen. Mercaptide zeigen meist das genannte Verhalten, wenngleich L-Cystein wider Erwarten keine Regulation des Enzyms bewirkt. Zu diesen Mercaptiden zählen z.B. Äthanthiol und analoge Verbindungen, reduziertes Glutathion , N-Acetyl-L-Cystein, Cysteamin, D/L-HCys, Dimethylsulfon und 3-Mercaptopropionsäure.
Auch Disulfide,wie D-Homocystin, Cystamin, oder oxidiertes Glutathion (GSSG) zeigen ebensolche Wirkung wie aromatische Sulfin- und Sulfonsäuren, von denen z.B. Benzolsulfin- und Benzolsulfonsäure zu nennen wären, sowie"Good"- Puffer. Bei Zugabe von Sulfat tritt für Äthanthiol und - dithiol, D/L-HCys, sowie reduziertes Glutathion keine Änderung ein, während für D-Methionin trotz geringen Wachstums normale Cysteinsynthaseaktivität ermittelt wird. Die Sulfatzugabe kann zu normalem Wachstum und Enzymwerten bei N-Acetyl-L-Cystein, S-Benzyl-L-Cystein,Propanthiol und Aminoäthylhydrogensulfat führen. Cysteamin und D-Homocystin dagegen steigern bei normalem Wachstum die Cysteinsynthase über die Normalwerte, während GSSG erhöhte Enzymaktivitäten bei normalem Wachstum aufweist.

2. Verbindungen, wie L-Cysteinäthylester, Thioharnstoff oder Äthandisulfonat hemmen das Wachstum zwar, weisen dafür aber normale Enzymwerte auf.
3. Eine Enzymhemmung kann für keine Verbindung allein beobachtet werden, während in Gegenwart von Sulfat Taurin und Aminomethansulfonsäure geringes Wachstum und Enzymaktivität zeigen.

4. Normales Wachstum bei erhöhten Enzymwerten werden z.B. für Thioäther, wie S-Methyl-L-Cystein und S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid, sowie D-Cys und DTE beobachtet. Sulfatzugabe kann bei normalem Wachstum zu normaler Cysteinsynthaseaktivität bei D-Cys wie auch zu erhöhter Aktivität, wie bei S-Methylcystein führen. Mercaptoäthanol steigert das Wachstum bei normalen Enzymwerten, während DTE geringes Wachstum bei erhöhtem Enzym zeigt. In diesem Falle ist noch zu beachten, daß bei DTE erst nach 3 Tagen gutes Wachstum einsetzt, was auf eine Oxidation schließen läßt, um dann als DTE_{ox} als S-Quelle verwertet werden zu können.

5. Eine Steigerung von Wachstum und Enzym wird nur für Sulfoessigsäure beobachtet, wobei Sulfatzugabe Normalwerte bewirkt.

3.4.2.3.2 Cysteinsynthase bei Synechococcus

Das Verhalten kann in 5 Gruppen eingeteilt werden:

1. Die Hauptgruppe zeigt, wie S-Mangel, bei niedrigem Wachstum erhöhte Enzymwerte. Neben Thiocyanat, Sulfatester, den Mercaptiden, N-Acetyl-L-Cystein, D/L-HCys, L-Cystin und einer Reihe von Thioäthern, wie L- und D-Methionin, S-Äthyl-L-Cystein, α-Keto-γ-Methiolbutyrat und Äthionin weisen alle Sulfin- und Sulfonsäuren sowie einige Sulfone und Sulfoxide, wie Methioninsulfon und -sulfoxid, das gleiche Verhalten auf.
Sulfatzugabe führt bei Thiosalicylsäure und S-Äthyl-L-Cystein zu Normalwerten, während L-Methioninsulfon, L- und D-Methionin normales Wachstum und erhöhte Cysteinsynthase und Hydroxyäthansulfonsäure erniedrigte Cysteinsynthase aufweisen. Sulfoessigsäure bewirkt bei normalen Enzymwerten ein besseres, Cysteinsäure und α-Keto-γ-Methiolbutyrat ein schlechteres Wachstum. Keine Änderung wird für L-Cystin beobachtet.

2. Trotz erniedrigtem Wachstum zeigen Mercaptide, wie ME, BAL oder DTE, sowie Thioäther, wie L-Methionin, und Taurin normale Enzymwerte. Sie werden durch Sulfatzugabe bei Mercaptiden nicht verändert. Normale Verhältnisse liegen bei Taurin vor, während L-Methionin das Enzym negativ beeinflußt. D-Homocystin steigert das Wachstum bei normalem Enzymwert.

3. Nur TES zeigt niedriges Wachstum und geringe Enzymaktivität.

4. Normales Wachstum bei erhöhtem Enzym tritt bei Thiosulfat, L- und D-Cystein sowie Phenolsulfonsäure auf, wobei Sulfatzugabe das Wachstum hemmt und normale Enzymwerte liefert.

5. Nur GSH fördert das Wachstum mit normalem Enzymwert. Sulfatzugabe reguliert das Wachstum zu Normalverhältnissen.

3.4.2.4 S-Sulfocysteinsynthase

Die Sulfocysteinsynthase, die bisher nur von Prokaryonten bekannt war, wurde nach dem Test 2.5.2 mit 100 µl Rohextrakt (2.1.1.2) gemessen. Auch hier war ein Nullwert ohne OAS nötig, um interne Cysteingehalte bei der Berechnung der enzymatischen Aktivität abziehen zu können.
Nach den unter 3.7.4.1 dargestellten Ergebnissen handelt es sich bei der "S-Sulfocysteinsynthase" von Grünalgen um die Enzymkette Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase, wobei Thiosulfat in Gegenwart von Dithiolen zu Sulfid reduziert wird, welches mit der Cysteinsynthase und OAS zu Cystein umgesetzt wird.

3.4.2.3.1 S-Sulfocysteinsynthase bei Chlorella

Das Verhalten des Enzyms kann in 6 Gruppen eingeteilt werden :

1. Ein Großteil der Verbindungen zeigt bei geringem Wachstum hohe Enzymaktivitäten, wie dies auch für S-Mangel beobachtet wird (3.4.1.1). Mercaptide, wie Äthanol und Homologe, sowie DTE, Cysteamin und D/L-Homocystin zeigen dieses Verhalten ebenso wie Thioäther, von denen nur Cystathionin oder Djenkolsäure genannt werden sollen. Alle verwerteten Sulfinsäuren sowie die Sulfone , L-Methioninsulfon und Dimethylsulfon, wie auch Sulfonsäuren, von denen nur Methan- und Benzolsulfonsäure erwähnt seien, gehören zu dieser Gruppe. Sulfatzugabe führt bei den Strukturanalogen Sulfanilsäure, Orthanilsäure und Sulfaminsäure sowie L-Cystein und Djenkolsäure zu normalem Wachstum bei normalen Enzymwerten. Elementarer Schwefel und Propanthiol steigern dagegen das Enzym. Nur bei L-Cystindiäthylester und D/L-Homocystein tritt keine Änderung auf.

2. Verbindungen wie D-Homocystin oder GSH hemmen wohl das Wachstum, führen aber zu normalen Enzymaktivitäten. Bei Zugabe von Sulfat werden für D-Homocystin und D-Cystin normale Verhältnisse beobachtet, wohingegen GSH trotz normalen Wachstums geringe Enzymwerte aufweist.

3. Nur Methioninamid zeigt trotz normalen Wachstums geringe Aktivität.

4. Eine erhöhte Enzymaktivität bei normalem Wachstum kann für Thiosulfat, L-Homocystein, L-Cystein, L-Cystin und Thioglycerin beobachtet werden, wobei Sulfatzugabe bei L-Cystein und L-Cystin das Wachstum steigert, das Enzym aber auf Normalwerte senkt, während Thioglycerin das Enzym stark erhöht.

5. Normale Enzymwerte können bei erhöhtem Wachstum für Sulfoessigsäure, Homocysteinsäure und Lanthionin beobachtet werden, wobei Sulfatzugabe .

bei Homocystein das Wachstum hemmt und Sulfoessigsäure normale Enzymwerte ergibt.

6. Sulfopropionsäure zeigt erhöhtes Wachstum und Enzymaktivität, die durch Sulfatzugabe normalisiert wird.

3.4.2.4.2 S-Sulfocysteinsynthase bei Synechococcus

Das Verhalten des Enzyms kann in 4 Gruppen eingeteilt werden :

1. Geringes Wachstum bei erhöhtem Enzym weisen Thioäther wie S-Äthyl-L-Cystein und Äthionin sowie L-Methionin auf. Sulfonsäuren wie Mercaptoäthansulfonsäure oder Hydroxyäthansulfonsäure sowie Sulfinsäuren und Sulfoxide wie L-Methioninsulfoxid gehören auch zu dieser Gruppe.
Sulfatzugabe zeigt bei S-Äthyl-L-Cystein und Hydroxyäthansulfonsäure Normalwerte, während bei L-Methionisulfon und -sulfoxid erhöhte Enzymwerte beobachtet werden.

2. Geringes Wachstum bei normalen Enzymwerten tritt bei S-Mangel, Thiocyanat, Tetrathionat, die Mercaptide ME, BAL, DTE und D-Cystin, D-Homocystin und L- und D-Methionin auf. Auch Sulfonsäuren wie Taurin, Cysteinsäure oder Sulfoessigsäure gehören dazu.
Sulfatzugabe ändert bei DTE die Verhältnisse nicht, während Cysteinsäure trotz geringen Wachstums normale Enzymwerte aufweist. D-Homocystin und Sulfoessigsäure steigern das Wachstum bei normalen Enzymwerten. Geringes Wachstum und niedrige Enzymaktivität beobachtet man für D-Methionin, während D-Cystin das Enzym erhöht.

3. Normales Wachstum mit erhöhtem Enzym kann für L-Homocystin, Djenkolsäure, α-Keto-γ-Methiolbutyrat beobachtet werden. Sulfatzugabe steigert das Wachstum bei normalem Enzymaktivitäten bei diesen Verbindungen.

4. Nur reduziertes Glutathion erhöht das Wachstum und das Enzym, wobei Sulfatzugabe das Wachstum normalisiert.

3.4.2.5 L-Cysteindesulfhydrase

Die L-Cysteindesulfhydrase wurde, wie unter 2.5.3.1 beschrieben, anhand der Freisetzung von Schwefelwasserstoff bestimmt. Auch hier war ein Nullwert ohne L-Cystein nötig, um den internen Gehalt an Cystein und anderen Schwefelwasserstoff-freisetzenden Substanzen abziehen zu können.
Für einen Teil der Verbindungen liegen keine Angaben vor, da dieses Enzym später in das Untersuchungsprogramm aufgenommen wurde.

Bevor auf die Versuchswerte eingegangen werden soll, sei noch erwähnt, daß elementarer Schwefel und Äthanthiol auch in Gegenwart von Sulfat sowie Äthanthiol, Dimethylsulfid und -sulfon und Benzolsulfonamid hohe Nullwerte an H_2S-bildendem Material lieferten, das z.B. Cystein oder gebundenes Sulfid sein könnte.

3.4.2.5.1 L-Cysteindesulfhydrase bei Chlorella

Es wurden 6 Gruppen beobachtet :

1. Die Hauptgruppe zeigt bei geringem Wachstum hohe Enzymwerte, wie sie bei S-Mangel beobachtet werden. Dazu gehören die Mercaptide, wie Äthanthiol und Homologe, Cysteamin und GSH, Thioäther, wie Cystathionin und D-Methionin, Sulfone, wie Dimethylsulfon, und Sulfonsäuren, wie aromatische Sulfonsäuren. Bei Sulfatzugabe treten bei D-Homocystin und Djenkolsäure normale Werte auf. Normale Enzymaktivitäten bei geringem Wachstum liegen bei Äthanthiol und GSH vor. Normales Wachstum ist bei Cystaemin mit geringer, bei Biotin mit hoher Enzymaktivität gekoppelt. Erhöhte Wachstum bei normalen Enzymwerten zeigen S-Carboxymethyl-L-Cystein, während DMSO das Enzym hemmt.
2. Geringes Wachstum bei normalem Enzym werden für GSSG und die "Good"-Puffer BES und MES beobachtet.
3. Cysteinsäure und L-Cysteinmethylester führen zu normalem Wachstum und niedriger Aktivität, wobei Sulfatzugabe bei L-Cysteinmethylester keine Änderung bewirkt.
4. Mercaptoäthansulfonsäure, Thioglycerin und S-Methyl-L-Cystein erhöhen dagegen die Enzymwerte.
5. Bei Sulfoessigsäure tritt bei erhöhtem Wachstum eine erhöhte Enzymaktivität auf, die durch Sulfatzugabe auf Normalwerte zurückgeht.
6. D/L-Homocystein zeigt dagegen gutes Wachstum und normale Enzymwerte,wobei Sulfatzugabe das Wachstum hemmt.

3.4.2.6 D-Cysteindesulfhydrase

Dieses Enzym wurde nach dem unter 2.5.3.2 beschriebenen Verfahren mit 100 µl Rohextrakt bestimmt. Es mußte stets ein Nullwert ohne D-Cystein mitgemessen werden.

3.4.2.6.1 D-Cysteindesulfhydrase bei Chlorella

Es können 4 verschiedene Gruppen unterschieden werden :

1. Geringes Wachstum bei erhöhten Enzymwerten kann für Mercaptide, wie Cysteamin und Äthandithiol, sowie für Thioäther wie D-Methionin und Djenkolsäure, und aromatische Sulfin- und Sulfonsäuren beobachtet werden. Sulfatzugabe bewirkt bei Cysteamin und Djenkolsäure Normalwerte, während D-Methionin und Äthandithiol nur eine normale Enzymaktivität zur Folge haben. Normales Wachstum bei erhöhtem Enzym tritt für Sulfanilsäure und L-Homocystin auf.

2. Eine Hemmung des Enzyms bei niedrigem Wachstum kann z.B. bei Thiocyanat, Äthanthiol und Biotin festgestellt werden. Sulfatzugabe führt bei Äthanthiol nur zu normalem Enzymwert, während Biotin auch normales Wachstum zeigt.

3. Ein normales Wachstum bei erhöhtem Enzymwert kann für Thioglycolsäure und DTE sowie Taurin und 3-Amino-1-propansulfonsäure beobachtet werden. Sulfatzugabe zu DTE hemmt das Wachstum bei normalem Enzym. Beide Werte sind bei S-Äthyl-L-Cystein und Liponsäureamid normal.

4. Nur S-Methyl-L-Cystein zeigt bei normalem Wachstum geringe Enzymaktivität. wobei Sulfatzugabe keine Änderung bewirkt.

3.4.2.7 Thiosulfatreduktase

Diese Enzym wurde nach der Vorschrift 2.5.4 bestimmt, wobei der Nullwert ohne Thiosulfat von besonderer Bedeutung ist. Bei einigen Verbindungen, wie L-Cysteinmethylester, L-Cysteinäthylester, Äthanthiol und homologe Verbindungen, elementarem Schwefel, Thiocyanat, Dimethylsulfon und - sulfid, können z.T. beachtlich hohe Nullwerte bei Chlorella beobachtet werden, die von "gebundenem Schwefel" stammen können und die Enzymwerte verfälschen würden.

3.4.2.7.1 Thiosulfatreduktase bei Chlorella

Die Verbindungen können in 5 Gruppen eingeteilt werden :

1. Hohe Enzymaktivitäten bei niedrigem Wachstum treten bei Schwefelmangel, Mercaptiden, wie Cysteamin, GSH und Äthanthiol, Thioäthern, wie D-Methionin, Sulfonen wie Methioninsulfon, Sulfinsäuren wie Formamidinsulfinsäure und Sulfonsäuren wie "Good"-Puffern oder Methansulfonsäure auf.
Sulfatzugabe führt bei GSH, L-Cystindiäthylester und Cystathionin zu keiner Veränderung, während N-Acetyl-L-Cystein, D-Homocystin und Djenkolsäure normale Werte bewirken. Normales Wachstum und erhöhte Enzymaktivität wird für Cysteamin Methansulfonsäure und Biotin beobachtet. Geringes Wachstum bei normalen Enzymwerten treten bei D/L-Homocystein, D-Methionin, Methioninsulfon und Äthanthiol auf. DMSO und S-Carboxymethyl-L-Cystein erhöhen beide Werte.

2. Sulfaminsäure und Äthandithiol hemmen sowohl Wachstum wie auch Enzymaktivität.

3. Normales Wachstum bei geringer Enzymaktivität wird für Thiodiessigsäuresulfoxid beobachtet.

4. Normales Wachstum und erhöhtes Enzym weisen Mercaptide, wie DTE und Mercaptoäthanol, D-Cys, Thioäther, wie S-Methyl-L-Cystein und S-Äthyl-L-Cystein sowie Sulfonsäuren, wie Äthansulfonsäure und Hydroxyäthansulfonsäure auf. Sulfatzugabe ändert bei D-Cys nichts, während Äthansulfonsäure und Hydroxyäthansulfonsäure Normalwerte zeigen. Normales Wachstum mit geringer Enzymaktivität tritt bei S-Methyl-L-Cystein und Thioglycolsäure auf. Normale Enzymwerte sind bei Mercaptoäthanol mit erhöhtem und bei DTE mit geringerem Wachstum gekoppelt.

5. Hohes Wachstum und hohe Enzymwerte treten bei Lanthionin und Sulfopropionsäure auf, wobei Sulfatzugabe bei letzterem Normalwert zeigt, während Lanthionin erhöhtes Wachstum bei normalem Enzymwert beibehält.

3.4.2.7.2 Thiosulfatreduktase bei Synechococcus

Da dieses Enzym nur bei wenigen Verbindungen untersucht wurde, treten nur 4 Gruppen auf :

1. Niedriges Wachstum bei erhöhtem Enzym kann für Dimethylsulfon, L- und D-Methionin, Benzolsulfonsäure, Sulfosalicylsäure und Thiosalicylsäure beobachtet werden. Sulfatzusatz führt bei L-Methionin zu normalen Werten, während bei D-Methionin geringeres Wachstum und normales Enzym auftritt.

2. Toluolsulfonsäure und α-Keto-γ-Methiolbutyrat zeigen geringes Wachstum und geringe Enzymaktivität, wobei Sulfatzugabe bei α-Keto-γ-Methiolbutyrat keine Änderung bewirkt.

3. Normale Enzymwerte bei niedrigem Wachstum treten bei S-Mangel bei Thiocyanat und den Mercaptiden, BAL, DTE, N-Acetyl-L-Cystein und D/L-HCys auf. L- wie D-Cystin und die Thioäther S-Äthyl-L-Cystein und Äthionin sind dabei ebenso wie aromatische Sulfonsäuren und L-Methioninsulfon zu nennen. Sulfatzugabe führte bei L-Methioninsulfon zu normalen Werten, während DTE beide Werte erniedrigt. Für L-Cystin werden Normalwerte beobachtet. D/L-HCys hemmt bei normalem Wachstum das Enzym.

4. Liponsäureamid hemmt das Enzym sehr, was durch Sufatzugabe aufgehoben werden kann.

3.4.2.8 Glutaminsynthetase

Dieses Enzym wurde nach 2.5.7 bestimmt.

3.4.2.8.1 Glutaminsynthetase bei Chlorella

Die Verbindungen können in 5 Gruppen eingeteilt werden :

1. Geringes Wachstum bei erhöhtem Enzym tritt bei Dithiolen, wie oxidiertem Glutathion und Cystamin, Thioäthern, wie Cystathionin und Djenkolsäure, Sulfinsäuren, wie Formamidinsulfinsäure und Benzolsulfinsäure sowie Sulfonsäuren, wie Methansulfonsäure auf. Sulfatzugabe ändert die Situation bei D/L-HCys, Cystathionin und Formamidinsulfinsäure nicht, während Methansulfonsäure und Dimethylsulfon Normalwerte zeigen. Geringes Wachstum und normale Enzymwerte treten bei Glutathion, Djenkolsäure, L-Methioninsulfon und bei Sulfosalicylsäure auf. Erhöhtes Wachstum mit normalen Enzymwerten wird bei BES beobachtet.

2. Geringes Wachstum und niedrige Enzymaktivität zeigen, wie dies von S-Mangel bekannt ist, Äthanthiol, L-Methioninsulfoximin, Biotin und N-Acetyl-L-Cystein.
Sulfatzugabe kann die Hemmung von L-Methioninsulfoximin nicht aufheben. Normalwerte werden dann bei Biotin, N-Acetyl-L-Cystein und Sulfaminsäure beobachtet, während Äthanthiol schlechtes Wachstum mit normalen Enzymwerten aufweist. S-Carboxymethyl-L-Cystein und S-Carboxyäthyl-L-Cystein steigern das Wachstum bei normaler Enzymaktivität.

3. Normales Wachstum bei erhöhter Enzymaktivität wird für Hydroxyäthansulfonsäure ; L-Homocystin und Liponsäureamid festgestellt, wobei Sulfatzugabe stets normale Werte ergibt.

4. Normales Wachstum bei geringer Aktivität tritt bei Thioglycerin, S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid und S-Äthylcystein auf. Auch hier stellt Sulfatzugabe normale Verhältnisse her.

5. Für S-Carbamoyl-L-Cystein wird erhöhtes Wachstum bei niedrigem Enzymspiegel beobachtet.

3.4.2.8.2 Glutaminsynthetase bei Synechococcus

Es treten 6 Gruppen auf :

1. Geringes Wachstum bei geringen Enzymaktivitäten wird für S-Mangel, Eisensulfid und Sulfatester beobachtet. Mercaptide, wie ME, DTE, N-Acetyl-L-Cystein und D/L-HCys, L- und D-Cystin sowie Thioäther, wie S-Methyl-L-Cystein

und S-Äthyl-L-Cystein, L- und D-Methionin, α-Keto-γ-Methiolbutyrat und die meisten Sulfonsäuren, wie Taurin und L-Cysteinsäure und einige Sulfoxide, wie DMSO zeigen dieses Verhalten.
Sulfatzugabe normalisiert bei Taurin und 3-Amino-1-propansulfonsäure die Werte, während L-Methioninsulfoxid und L-Cystin normales Wachstum mit erhöhtem Enzymwert aufweist. Erstaunlicher Weise hemmten S-Äthyl-L-Cystein und D-Methionin im Gegensatz zu S-Methyl-L-Cystein, welches das Enzym steigert, das Enzym. Sulfoessigsäure erhöht beide Werte, DTE und α-Keto-γ-Methiolbutyrat hemmen sie. L-Cysteinsäure beeinflußt nur das Wachstum negativ. D-Cystin hemmt bei erhöhtem Wachstum ebenso wie L-Methionin und D/L-HCys bei normalem Wachstum das Enzym.

2. Geringes Wachstum unter erhöhtem Enzymwert treten bei Thiodiglycolsäure, Mercaptoäthansulfonsäure und 2,2-Thioessigsäure auf.

3. Schlechtes Wachstum mit normalen Enzymwerten treten bei Thioäthern, wie L-Methionin oder Äthionin sowie aromatischen Sulfonsäuren auf, wobei Sulfatzugabe bei L-Methionin Normalwerte ergab.

4. Normales Wachstum mit erhöhtem Enzymwert tritt bei Thioessigsäure auf.

5. Normales Wachstum bei erniedrigtem Enzym wird bei D-Cys, Mercaptopyruvat und Liponsäure beobachtet, wobei Sulfatzugabe für Liponsäureamid keine Änderung bewirkt, während das Wachstum für D-Cys und Mercaptopyruvat gehemmt wird.

6. Glutathion weist ein hohes Wachstum und normale Enzymwerte auf, welche durch Sulfatzugabe normalisiert wird.

3.4.2.9 "gebundenes Sulfid"

Das in diesem Kapitel betrachtete Sulfid stellt den Methanol-unlöslichen Niederschlag der Chlorophyllextraktion dar, der Schwefelwasserstoff mit DTE freisetzen kann. Das "gebundene Sulfid" wurde nach 2.5.5 bestimmt. Die Ergebnisse sind schwer zu interpretieren.

3.4.2.9.1 "gebundenes Sulfid" bei Chlorella

Die Verbindungen werden in 3 Gruppen aufgeteilt :

1. Erhöhte Werte bei geringem Wachstum zeigen elementarer Schwefel, S-Mangel, Eisensulfid, Mercaptide, wie Äthanthiol und Homologe, L-CME, Cysteamin und Cystindiäthylester sowie Sulfatester, Thioäther, wie Cystathionin und D-Cystin und Sulfonsäuren, wie Methansulfonsäure.
Sulfatzugabe bewirkt bei Formamidinsulfinsäure, Cystathionin, L-Cystindiäthyl-

ester und S-Carboxyäthyl-L-cystein keine Veränderung, während Sulfatester und Cysteamin Normalwerte zeigen. Geringes Wachstum bei normalen Werten treten bei Äthandithiol und Äthanthiol auf. Normales Wachstum mit erhöhten Sulfidmengen beobachtet man bei Biotin, Methansulfonsäure und Liponsäureamid.

2. Geringes Wachstum und Sulfidmengen treten bei Mercaptopropionsäure, D-Cystin und Benzolsulfonamid auf, wobei Sulfatzugabe bei Mercaptopropionsäure normales Wachstum aufweist.
3. L-CME führt zu erhöhten Werten bei normalem Wachstum, was auch Sulfatzugabe nicht ändern kann.

3.4.2.9.2 "gebundenes Sulfid" bei Synechococcus

Es wurden 4 Gruppen beobachtet :

1. Niedriges Wachstum bei hohem Sulfidgehalt treten bei D/L-HCys, L- und D-Methionin, L-Methioninamid, L- und D-Cystin und Sulfoessigsäure auf. Sulfatzugabe führt bei L-Methionin zu Normalwerten, bei D-Methionin und L-Cystin zu niedrigem Wachstum und normalem Sulfidgehalt. D/L-HCys hemmt trotz normalen Wachstums den Sulfidgehalt, während D-Cystin das Wachstum stimuliert, wobei der Sulfidgehalt normal bleibt.
2. Geringes Wachstum bei normalem Sulfidgehalt wird für S-Mangel, Eisensulfid, Thiocyanat und Mercaptide, wie Mercaptopyruvat, ME, BAL, DTE und aromatische Sulfinsäuren sowie Sulfonsäuren, wie L-Cysteinsäure beobachtet. Sulfatzugabe liefert bei S-Äthyl-L-Cystein normale Daten, während DTE nur das Wachstum hemmt und Mercaptopyruvat den Sulfidgehalt steigert.
3. Biotin hemmt Wachstum und Sulfidbildung.
4. Elementarer Schwefel und Thioacetamid führen zu erhöhten Sulfidgehalten bei normalem Wachstum.

3.4.3 Regulation unter Kurzzeitbedingungen bei Chlorella

Die folgenden Versuche wurden in analoger Weise zu den Standardbedingungen (S) (3.4.2) durchgeführt, wobei zum einen die Kulturen nur 4 Tage auf der S-Quelle wuchsen (exponentielle Kultur (E)), zum anderen nach 3 Tagen Wachstum auf Sulfatmedium zusätzlich eine S-Verbindung zugesetzt bekamen (Kurzzeitkultur (K)) (Tab. 20). Die beiden verschiedenen Kulturen sind daher nicht wie bei Standardkulturen vergleichbar. Da die Kulturen sich noch in der mittleren logarithmischen Phase befanden, können einige beim stationären Wachstum auftretende Einflüsse ausgeschlossen werden, so daß die direkte Wirkung der S-Verbindung deutlich hervortritt.

Tab. 20 : Enzymregulation bei Chlorella beim exponentiellem Wachstum und unter Kurzzeitbedingungen

Schwefelverbindung im Medium		Chl.	SA	CS	SCS	L-CD	D-CD	TSR	GS	g.S.	ß-C
A) Exponentielles Wachstum (E) (4 Tage Wachstum auf der genannten Verbindung)											
Natriumsulfat n = 8	$\bar{m}$	2,21	1149	202	1,95	431	2077	5,5	523	84	288
	σ	0,54	380	107	1,94	106	416	1,3	166	25	230
	$\bar{m} \pm \sigma$	2,75	1529	309	3,89	538	2493	6,8	689	109	518
		1,67	769	95	0,01	324	1660	4,2	357	59	59
Mercaptopyruvat		1,91	859	146	2,23	352	1742	4,9	366	0	585
O-Acetyl-L-Serin		0,09	2066	142	11,42	1972	3144	18,5	286	58	3326
Phospho-L-Serin		1,51	136	25	1,69	246	459	1,8	35	741	355
L-Cystein		1,01	500	107	5,21	644	2261	7,8	219	99	621
L-Cystein/O-Acetyl-L-Serin		0,78	1313	125	6,18	480	2088	6,4	245	113	664
L-Cystein/Phospho-L-Serin		0,45	1993	141	10,16	1200	3768	8,5	416	195	1154
D-Cystein		1,84	221	41	2,86	263	494	1,9	34	79	611
D-Cystein/O-Acetyl-L-Serin		k.W.	----	---	----	----	----	----	---	---	----
D-Cystein/Phospho-L-Serin		k.W.	----	---	----	----	----	----	---	---	----
L-Cysteinäthylester		0,13	5697	248	2,12	1161	2505	27,5	975	10629Y	3839
L-Cysteinäthylester/O-Acetyl-L-Serin		0,20	2374	61	13,19	0	1913	2,5	238	3640Y	1420
L Cysteinäthylester/Phospho-L-Serin		0,07	2925	140	58,16	0	3020	24,5	427	14065Y	4604
L-Cystin		3,00	1600	117	2,21	493	2211	7,3	433	55	349
D-Cystin		1,28	870	204	3,69	654	1816	11,0	366	57	113
L-Methionin		0,66	425	197	2,14	943	f	11,4	432	170	f
D-Methionin		0,35	552	230	6,76	1290	f	33,5	556	271	f
B) Wachstum unter Kurzzeitbedingungen (3 Tage Wachstum auf Sulfatmedium und 24 Stunden zusätzlich mit den genannten Verbindungen)											
Mercaptopyruvat		3,14	337	83	0,88	108	1056	2,7	474	0	324
Mercaptopyruvat/O-Acetyl-L-Serin		4,47	271	82	0,52	273	1060	2,0	443	0	343
Mercaptopyruvat/L-Cystein		4,40	459	75	1,60	293	934	2,2	248	62	307
Mercaptopyruvat/L-Cysteinäthylester		5,06	789	65	0,74	57	1000	1,6	255	6	271
L-Serin		1,94	1522	376	4,64	160	f	4,3	516	105	f
N-Acetyl-L-Serin		1,38	1473	197	0,82	390	f	1,8	476	113	f
O-Acetyl-L-Serin		2,34	2805	130	1,75	427	1144	6,3	490	287	322
Phospho-L-Serin		1,32	3287	157	1,71	373	2866	5,7	1038	91	789
L-Cystein		0,96	1201	186	2,09	718	185	7,0	281	91	771
L-Cystein/O-Acetyl-L-Serin		2,92	2063	150	2,12	851	2987	7,0	549	84	590
L-Cystein/Phospho-L-Serin		0,72	1706	155	8,02	1029	3181	6,5	397	218	925
D-Cystein		0,86	984	156	0,57	672	2700	8,9	255	93	451
D-Cystein/O-Acetyl-L-Serin		0,36	1931	125	6,28	1063	2960	8,4	389	179	1268
D-Cystein/Phospho-L-Serin		0,13	1178	159	20,34	1684	3402	9,1	276	370	1363
L-Cysteinmethylester		1,90	1112	216	0,65	540	1410	8,6	396	134	f
L-Cysteinmethylester/O-Acetyl-L-Serin		0,84	1736	255	2,94	630	1970	12,6	584	190	f
L-Cysteinäthylester		1,43	4579	234	1,34	510	2057	8,1	939	343Y	749
L-Cysteinäthylester/O-Acetyl-L-Serin		1,28	1090	150*	1,73	464	1034	3,8	380	219Y	47
L-Cysteinäthylester/Phospho-L-Serin		0,48	1213	47	2,05	390	1502	3,9	638	145	814

Tab. 20 : Fortsetzung 1

Schwefelverbindung im Medium	Chl.	SA	CS	SCS	L-CD	D-CD	TSR	GS	g.S.	ß-C
L-Cysteinathylester/L-Methionin	1,11	f	100	2,70	510	f	7,4	506	274	f
L-Cysteinäthylester/L-Serin	1,46	4828	194	0,80	420	f	4,1	624	437	f
L-Cysteinäthylester/N-Acetyl-L-Serin	0,65	3955	108	4,04	880	f	7,8	668	654	f
D/L-Homocystein	0,33	7969	607	0,82	1500	f	18,9	2752	154	f
Cysteamin	1,41	1095	111	0,39	580	1770	5,9	532	65	f
L-Cystin	2,75	1877	149	2,75	388	2356	7,0	341	82	0
L-Cystin/O-Acetyl-L-Serin	2,46	1820	179	3,26	504	2298	7,6	457	82	0
L-Cystin/Phospho-L-Serin	3,44	897	76	1,39	247	1211	3,2	131	55	141
L-Cystin/L-Methionin	2,58	1392	97	1,69	297	1439	4,2	407	59	103
D-Cystin	2,19	2251	175	0,12	0	651	5,5	291	79	73
D-Cystin/O-Acetyl-L-Serin	3,14	1411	136	1,88	601	2750	7,2	686	76	155
D-Cystin/Phospho-L-Serin	2,27	1651	121	1,62	480	2073	5,3	652	61	125
D-Cystin/L-Methionin	3,29	1054	76	1,02	247	1213	2,9	330	55	86
S-Methyl-L-Cystein	2,22	2823	205	0,52	890	1230	7,5	340	78	f
S-Methyl-L-Cystein/O-Acetyl-L-Serin	1,73	2060	197	0,56	800	1250	8,9	384	87	f
L-Methionin	1,35	1402	89	0,76	395	1940	6,0	340	192	f
D-Methionin	1,62	2849	162	0,64	470	1480	6,5	500	40	f
S-Methyl-L-Methionin	1,52	521	86	0,47	170	f	3,8	296	84	f
Lanthionin	1,24	1357	226	0,30	670	2250	9,2	292	83	f
L-Methioninsulfoximin	3,11	252	101	0,47	414	1515	1,8	223	0	400
1,2,4-Triazol	0,89	157	87	1,36	878	1506	3,9	467	0	632

Beim exponentiellen Wachstum (E) wuchsen die Chlorella-Kulturen für 4 Tage auf S-Mangelmedium (2.1.1.1), dem die genannten Verbindungen (3 x 10^{-4}M) zugesetzt worden waren.
Kurzzeitbedingungen (K) herrschten bei solchen Kulturen, die 3 Tage auf Sulfatmedium (2 x 10^{-4}M) gewachsen waren und für 24 Stunden zusätzlich die genannten Verbindungen (3 x 10^{-4}M) enthielten.
Die Aufarbeitung der Kulturen geschah wie unter 3.4.2 beschrieben. Die Einheiten sind :

Chl. = Chlorophyll (mg x 750 ml Medium^{-1}); SA = Sulfataktivierung (nmol säurelabiles (^{35}S)-Sulfit x mg Chlorophyll^{-1} x h^{-1}); CS = Cysteinsynthase (µmol Cystein x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1});
SCS = S-Sulfocysteinsynthase (µmol "Cystein" x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); L-CD = L-Cysteindesulfhydrase (nmol Sulfid x Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); D-CD = D-Cysteindesulfhydrase (nmol Sulfid x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1});
TSR = Thiosulfatreduktase (µmol Sulfid x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); GS = Glutaminsynthetase (µmol umgesetztes Glutamin x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); g.S. = gebundenes Sulfid (nmol Sulfid x mg Chl.$^{-1}$);
ß-C = ß-Cyanoalaninsynthetase (nmol Sulfid x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}).

f = Angaben fehlen; * = hohe Cystein-Nullwerte (3.6); Y = hohe Sulfid-Nullwerte (3.5).

3.4.3.1 Wachstum

Beim viertägigem Wachstum auf den S-Quellenkombinationen D-Cys/OAS und D-Cys/PSer tritt eine vollständige Hemmung ein, die für die entsprechende Kombination mit L-Cystein nicht beobachtet werden konnte.
Ein geringes Wachstum beobachtet man bei PSer, L-Cys, L-CÄE, L-CÄE/OAS bzw./PSer

L- und D-Methionin. Eine Wachstumssteigerung bewirkt nur L-Cys. Unter Kurzzeitbedingungen wächst Chlorella auf PSer, L-Cys, L-Cys/PSer, D-Cys, D-Cys/OAS bzw. / PSer, L-CÄE und seiner Kombination mit OAS, PSer, L-Methionin, L-Ser und NAS schlecht.
Auch L-CME/OAS, D,L-HCys, Cysteamin, L- und D-Methionin, S-Methyl-L-Methionin, Lanthionin, Triazol und NAS hemmen das Wachstum.
Eine Wachstumssteigerung tritt bei Mercaptopyruvat, L-Cys/OAS bzw. /Mercaptopyruvat, Mercaptopyruvat/OAS bzw. L-CÄE, L-Cystin/PSer, D-Cystin/OAS bzw. /L-Methionin und L-Methioninsulfoximin auf.

3.4.3.2 Sulfataktivierung

Ein viertägiges Wachstum auf den in Tab. 20 genannten Verbindungen kann bei gehemmtem Wachstum erhöhte Sulfataktivierung aufweisen, wie dies bei OAS, L-Cys/PSer, L-CÄE, L-CÄE/OAS bzw. /PSer beobachtet wird.
Normales Wachstum bei erhöhten Enzymen tritt nur bei Mercaptopyruvat auf, während L-Cystin auch erhöhtes Wachstum zeigt. Eine Hemmung von Wachstum und Sulfataktivierung bewirken PSer im Gegensatz zu OAS, welches die Enzyme steigert, L-Cys und L-Methionin, wohingegen D-Methionin zu normalen Enzymaktivitäten bei geringem Wachstum führt. Nur D-Cys zeigt trotz normalen Wachstums gehemmte Sulfataktivierung.
Beim Kurzzeitwachstum erhöht der Zusatz von L-Cystin, L-Cystin/OAS, D-Cystin, D-Cystin/PSer, S-Methyl-L-Cystein, S-Methyl-L-Cystein/OAS sowie L-CME nur die Enzyme, während L-Cys Wachstum und Enzyme steigert. Geringes Wachstum bei erhöhter Sulfataktivierung kann für PSer, L-Cys/PSer, L-CME/OAS,L-CME und D-Cys/OAS, L-CÄE/OAS bzw. /L-Ser bzw. /NAS, D,L-HCys und D-Methionin beobachtet werden. Eine Hemmung der Enzyme bei erhöhtem Wachstum tritt bei Mercaptopyruvat und L-Methioninsulfoximin auf. S-Methyl-L-Methionin und Triazol hemmen Wachstum und Sulfataktivierung.

3.4.3.3 Cysteinsynthase

Bei exponentiellem Wachstum kann keine Stimulierung des Enzyms, nur eine Hemmung von Wachstum und Enzym bei PSer und der S-Quellenkombinationen L-CÄE/OAS beobachtet werden. D-Cys zeigt im Gegesatz zu L-Cys, welches Normalwerte aufweist, bei normalem Wachstum erniedrigtes Enzym.
Die Kurzzeitbedingungen führen nur bei L-Ser zu erhöhter Cysteinsynthase. Eine Hemmung von Wachstum und Enzym tritt bei L-CÄE/PSer, L-Methionin, S-Methyl-L-Methionin und Triazol auf. Ein gesteigertes Wachstum bei gehemmter Cysteinsyn-

thase wird für Mercaptopyruvat, Mercaptopyruvat/L-Cys bzw. /OAS, L-Cystin/PSer, D-Cystin/L-Methionin und D/L-HCys gemessen.

3.4.3.4 S-Sulfocysteinsynthase

Dieses Enzym, dessen Gesamtaktivität sich bei Chlorella aus den Enzymen Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase zusammensetzt (3.7.5.4),weist bei exponentiellem Wachstum auf OAS, L-Cys, L-Cys/OAS bzw. /PSer, L-CÄE und D-Methionin geringes Wachstum und erhöhte Gesamtaktivität auf.
Kurzzeitbedungungen führen bei L-Cys/PSer, D-Cys/OAS bzw. /L-Ser, L-CÄE/NAS zu gleichem Verhalten, während L-Ser normales Wachstum bewirkt. L-Cystin dagegen hemmt bei normalem Wachstum die Gesamtaktivität.

3.4.3.5 L-Cysteindesulfhydrase

Dieses Enzym wird in der exponentiellen Phase durch OAS, L-Cys/PSer, D-Cystin, L-CÄE, L- und D-Methionin beigeringem Wachstum stimuliert. Eine Hemmung von Wachstum und Enzym tritt bei PSer auf, während L-CÄE/OAS bzw. /PSer keine Aktivität aufweisen. D-Cys zeigt ein normales Wachstum bei niedriger L-Cysteindesulfhydrase.
Unter Kurzzeitbedingungen kann wieder geringes Wachstum bei erhöhtem Enzym für L-Cys, L-Cys/PSer, D-Cys, D-Cys/OAS, bzw. /PSer, L-CÄE/NAS, D/L-HSer und L-Methionin beobachtet werden. Erhöhtes Enzym ist bei S-Methyl-L-Cystein und S-Methyl-L-Cystein/OAS mit normalen und bei L-Cys/OAS mit erhöhtem Wachstum gekoppelt. Gesteigertes Wachstum mit gehemmtem Enzym wird für Mercaptopyruvat, Mercaptopyruvat/L-Cys bzw. /OAS bzw. /L-CÄE, L-Cystin/PSer gemessen, wohingegen L-Ser und D-Cystin/L-Methionin normales Wachstum mit stark gehemmtem Enzym zeigen. D-Cystin führt trotz guten Wachstums zu einer vollständigen Hemmung des Enzyms. D-Methionin bewirkt schlechtes Wachstum und geringe Enzymaktivität.

3.4.3.6 D-Cysteindesulfhydrase

Viertägiges Wachstum hemmt bei OAS, L-Cys/PSer, L-CME und L-CÄE/PSer das Wachstum, wobei ein erhöhtes Enzym beobachtet werden kann. PSer hemmt die Werte, während D-Cys normales Wachstum zur Folge hat.
Kurzzeitbedingungen führen bei PSer, L-Cys/PSer, D-Cys, D-Cys/OAS bzw. /PSer zu geringem Wachstum aber hoher D-Cysteindesulfhydraseaktivität. Nur L-Cys/OAS und D-Cystin/OAS erhöhen beide Werte. Eine Hemmung des Enzyms bei erhöhtem Wachstum wird für Mercaptopyruvat, Mercaptopyruvat/L-Cys bzw. /OAS, L-Cystin/

/PSer, D-Cys/L-Methionin und L-Methioninsulfoximin beobachtet. Normales Wachstum mit weiterhin geringem Enzym zeigen OAS, L-Cystin/L-Methionin, D-Cystin, S-Methyl-L-Cystein, S-Methyl-L-Cystein OAS und L-CME. Beide Werte sind bei L-CÄE/OAS bzw. PSer, D-Methionin und Triazol gehemmt.

3.4.3.7 Thiosulfatreduktase

Dieses Enzym wird bei geringem Wachstum unter exponentiellen Bedingungen bei OAS, L-Cys, L-Cys/PSer, D-Cystin, L-CÄE, L-CÄE/PSer, L- und D-Metionin gesteigert. Nur L-Cystin erhöht beide Werte. PSer und L-CÄE/OAS hemmen dagegen Wachstum und Enzym, während D-Cys normales Wachstum bewirkt.
Kurzzeitbedingungen führen zu geringem Wachstum bei erhöhtem Enzym bei L-Cys, D-Cys, D-Cys/OAS bzw. /PSer, Lanthionin, L-CME/OAS, L-CÄE, L-CÄE/OAS bzw. /L-Methionin bzw. /NAS und D/L-HCys. Normales Wachstum bei weiterhin erhöhtem Enzym tritt bei L-Cystin, L-Cystin/OAS, S-Methyl-L-Serin, S-Methyl-L-Cystein/OAS und L-CME auf. L-Cys/OAS und D-Cystin/OAS stimulieren beide Enzyme. Erhöhtes Wachstum bei gehemmter Enzymaktivität bewirken Mercaptopyruvat, Mercaptopyruvat/L-Cys bzw. /L-CÄE bzw. /OAS, L-Cystin/PSer und D-Cystin/L-Methionin. Eine Hemmung beider Enzyme bewirkt NAS, L-CÄE/PSer bzw. /L-Ser und S-Methyl-L-Methionin.

3.4.3.8 Glutaminsynthetase

Nur L-CÄE kann unter exponentiellen Bedingungen das Enzym bei geringem Wachstum erhöhen. D-Cys hemmt bei normalem Wachstum das Enzym allein, während OAS, PSer, L-Cys, L-Cys/OAS und L-CÄE/OAS beide Werte reduziert.
Kurzzeitbedingungen haben bei PSer, L-CÄE und D/L-Homocystein geringes Wachstum und erhöhtes Enzym zur Folge. Gehemmtes Enzym bei erhöhtem Wachstum beobachtet man dagegen bei Mercaptopyruvat/L-Cys, D-Cys/L-Methionin, L-Cystin/PSer und L-CÄE/Mercaptopyruvat. Normales Wachstum und gehemmtes Enzym zeigen L-Cystin, D-Cystin und S-Methyl-L-Cystein. Beide Werte sind bei L- und D-Cys, D-Cys/PSer, L-Methionin, S-Methyl-L-Methionin und Lanthionin gehemmt.

3.4.3.9 "Gebundenes Sulfid"

Exponentielle Bedingungen führen bei PSer, L-Cys/OAS bzw. /PSer, L-CÄE, L-CÄE/OAS bzw. /PSer, L- und D-Methionin bei geringem Wachstum zu erhöhtem Sulfidgehalt. OAS und D-Cys hemmen beide Werte, während L-Cystin das Wachstum steigert. Bei Mercaptopyruvat ist kein Sulfid meßbar.
Kurzzeitbedingungen weisen bei NAS, L-Cys/PSer, D-Cys/OAS bzw. /PSer, L-CME/OAS, L-CÄE, L-CÄE/OAS bzw. /PSer bzw. /L-Methionin bzw. /NAS, D/L-HCys,

Cysteamin und L-Methionin erhöhten Sulfidgehalt bei geringem Wachstum auf. Nur OAS und L-CME zeigen normales Wachstum. Erhöhtes Wachstum bei geringem Sulfidgehalt beobachtet man bei Mercaptopyruvat/L-CÄE, L-Cystin/PSer, D-Cystin/L-Methionin und L-Methioninsulfoximin. Kein Sulfidgehalt tritt trotz normalen Wachstums bei Mercaptopyruvat und Mercaptopyruvat/OAS auf. Beide Werte sind bei D-Methionin und Triazol gesenkt.

3.4.3.10 ß-Cyanoalaninsynthetase

Dieses Enzym wurde unter Standardbedingungen nicht bestimmt.
Da jedoch in Kapitel 3.7. zu prüfen war, ob es sich um eine eigenständige Enzymaktivität oder eine Seitenaktivität der Cysteinsynthase handeln könnte, wurden seine Regulation unter Exponentiellen Bedingungen bei Chlorella gemessen. Mercaptopyruvat erhöht bei normalem Wachstum , und L-CÄE und L-CÄE/OAS bei geringem Wachstum das Enzym. Eine Hemmung konnte nicht beobachtet werden.

Kurzzeitbedingungen führen bei L-CÄE/PSer und Triazol zu geringem Wachstum und erhöhtem Enzym. Eine Hemmung tritt bei L-Cys und L-Cystin/OAS gekoppelt mit normalem, bei L-CÄE/OAS mit geringem Wachstum auf.

3.4.4 Regulation bei anderen Organismen

3.4.4.1 Regulation bei Blau- und Rotalgen

Untersucht man das Verhalten von Blau- und Rotalgen beim fünftägigen Wachstum auf Sulfat- oder S-Mangel-Medium (Tab. 21), so tritt bei Blaualgen eine erheblich höhere Gesamtprotein- und -chlorophyllmenge auf. S-Mangel reduziert prinzipiell das Wachstum, wobei Spirulina am wenigsten gehemmt wird (30 % des Sulfatwertes bezogen auf den Proteingehalt). Synechococcus 6301 mit dem größten Protein- und Chlorophyllgehalt dagegen wächst auf S-Mangel relativ schlecht (2 %).
Die Cysteinsynthase hat bei Synechococcus 6301 die höchste Aktivität. S-Mangel erhöht bei allen Blaualgen sowie bei Porphyridium das Enzym. Nur Cyanidium wird nicht beeinflußt. Die L-Cysteindesulfhydrase hat sehr geringe Werte, die durch S-Mangel etwas erhöht werden. Im Gegensatz zu Grünalgen (3.4.4.2) liegen die D-Cysteindesulfhydrase-Aktivitäten noch unter denen der L-Cysteindesulfhydrase. Sie werden auch durch S-Mangel leicht erhöht.
Die Thiosulfatreduktase ist bei Rotalgen höher als bei Blaualgen, wobei S-Mangel bei Synechococcus 6301 eine starke Stimulierung aufweist.
Die Glutaminsynthetase hat bei LPP maximale Werte. S-Mangel erhöht bei Synechococcus 6301 die Aktivität, während Synechococcus 6312, Anabaena variabilis 7120 gleiche Werte zeigen. Bei Xenococcus, LPP, Anabaena cylindrica, Nostoc und Calothrix wird dagegen die Enzymaktivität z.T. stark gehemmt.

Tab. 21 : Enzymregulation bei Blau- und Rotalgen

Organismus	PCC-Nr.	Sulfat-zugabe	Chl.	Prot.	CS	L-CD	D-CD	TSR	GS
	Blaualgen								
Sektion 1 :									
Synechococcus	6301	+	138,00	4,12	13,11	7	1	45	20,10
		-	3,20	0,35	51,42	50	37	837	56,00
	6312	+	69,45	1,85	0,68	4	2	48	6,43
		-	7,34	0,18	8,67	8	4	105	5,32
Gloeobacter	7421	+	14,66	0,10	4,31	50	9	38	11,59
Sektion 2 :									
Xenococcus	7307	+	39,77	0,86	0,47	4	1	3	20,31
		-	3,90	0,10	2,89	54	9	202	0,03
Sektion 3 :									
Spirulina	6313	+	32,54	0,34	3,34	26	2	147	4,10
LPP	73110	+	56,39	1,44	1,71	34	4	38	30,83
		-	17,23	0,21	13,05	9	3	128	6,16
	7408	+	64,53	2,79	0,33	10	1	31	29,64
		-	4,75	0,09	1,04	31	16	78	1,80
Sektion 4 :									
Anabaena cylindrica	7122	+	26,82	0,95	1,84	f	4	92	17,34
		-	4,03	0,09	3,12	f	8	76	10,92
variabilis	7120	+	79,41	1,74	1,30	f	2	10	11,43
		-	13,86	0,27	3,39	f	11	36	10,08
variabilis	6309	+	18,69	0,95	1,36	f	7	6	11,97
Nostoc	6310	+	46,03	0,95	1,99	9	2	29	11,72
		-	1,93	0,16	4,89	50	5	43	16,42
	Rotalgen								
Porphyridium		+	7,73	0,5	1,15	f	46	122	f
		-	1,09	0,03	16,72	217	57	256	f
Cyanidium		+	5,78	0,09	4,44	19	13	325	f
		-	1,15	0,01	4,33	126	36	574	f

Abkürzungen :

PCC-Nr. = Nummer der Stammkultur des Pasteur-Instituts, Paris; Prot. = Protein (mg x 750 ml Medium^{-1});
Chl. = Chlorophyll (mg x 750 ml Medium^{-1}); CS = Cysteinsynthase (µmol Cystein x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1});
L-CD = L-Cysteindesulfhydrase (nmol Sulfid x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1}); D-CD = D-Cysteindesulfhydrase (nmol Sulfid x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1}); TSR = Thiosulfatreduktase (nmol Sulfid x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1});
GS = Glutaminsynthetase (µmol umgesetztes Glutamin x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1}); f = Daten fehlen.

Die Algen wurden, wie unter 2.1.2 beschrieben, auf einem S-Mangel- oder Sulfatmedium (2.1.1.1) angezogen. Die Teste wurden nach 3.4.2 durchgeführt.

Frau Biedlingmaier sei für die Anzucht der Blaualgen gedankt.

Für Regulationsversuche erschien daher Synechococcus 6301 sehr geeignet zu sein. Auch LPP könnte interessante Ergebnisse liefern, da hier die Glutaminsynthetase ein entgegengesetztes Verhalten aufweist.

Tab. 22 : Enzymregulation bei Grünalgen

Organismus	SAG-Nr.	Sulfat-zusatz	Prot.	Chl.	CS	L-CD	D-CD	TSR	GS
		Euglenophyceae							
Euglena gracilis	DSM 1226-415	+	87,30	14,85	3,51	33	5	0,17	0,41
		-	5,36	0,07	13,67	1	38	0,63	0,69
		Chlorophyceae							
Chlamydomonas reinhardtii	11-32a	+	30,48	7,55	1,00	9	19	0,64	8,70
		-	6,08	0,66	1,27	14	140	0,35	7,10
Chlorella fusca	211-8b	+	41,88	3,81	13,26	43	121	0,39	20,20
		-	0,66	0,04	147,60	800	269	30,37	1,70
	211-11n	+	f	f	0,96	22	168	0,34	4,60
kessleri	211-11h	+	f	f	17,60	21	84	0,40	15,40
saccharophila	211-9a	+	f	f	1,16	93	93	0,09	0,60
sorokiniana	211-8k	+	72,40	6,10	9,65	62	55	6,10	44,00
		-	3,87	0,36	17,60	833	528	1,07	83,00
Coelaestrum proboscideum	217-2	+	f	f	0,68	28	18	0,22	4,70
Haematococcus vulgaris	211-1e	+	f	f	2,11	67	4	0,30	3,10
	211-11c	+	23,99	3,20	0,80	56	130	0,59	5,10
		-	4,55	0,10	0,61	615	759	0,68	8,80
Scenedesmus armatus subalternus	276-4a	+	40,96	3,40	0,64	75	64	0,04	9,80
		-	2,17	0,08	0,13	179	127	0,30	3,50
commi	276-4b	+	23,91	2,54	0,00	42	62	0,03	0,80
		-	2,17	0,04	0,00	428	221	0,12	1,20
obliquus	276-3a	+	29,01	3,00	1,10	43	40	0,72	2,50
		-	1,1	0,15	4,76	350	136	3,57	4,00

Abkürzungen :

SAG-Nr. = Nummer der Stammkultur der Algensammlung Göttingen; DSM = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen;
Prot. = Proteingehalt (mg x 750 ml Medium^{-1}); Chl. = Chlorophyll (mg x 750 ml Medium);
CS = Cysteinsynthase (µmol Cystein x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1}); L-CD = L-Cysteindesulfhydrase (nmol Sulfid x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1}); D-CD = D-Cysteindesulfhydrase (nmol Sulfid x mg Prot.$^{-1}$ x x h^{-1}); TSR = Thiosulfatreduktase (µmol Sulfid x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1});
GS = Glutaminsynthetase (µmol umgesetztes Glutamin x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1}), f = Daten fehlen.

Die Algen wurden, wie unter 2.1.2 beschrieben, auf einem S-Mangel- oder Sulfatmedium (2.1.1.1) angezogen.
Die Teste wurden nach 3.4.2 durchgeführt.

Frau Biedlingmaier sei für die Anzucht der Grünalgen gedankt.

3.4.4.2 Regulation bei Grünalgen

Vergleicht man das Verhalten von verschiedenen Grünalgen beim Wachstum auf Sulfat- oder S-Mangel-Medium, so werden große Unterschiede bezüglich der untersuchten Enzyme deutlich (Tab. 22).
Euglena gracilis zeigt bei 5-tägigem Wachstum auf Sulfat den höchsten Gesamtprotein- bzw. chlorophyllgehalt. Prinzipiell verzögert S-Mangel das Wachstum, wobei aber das Verhältnis von S-Mangel- zu Sulfatwerten stark schwankt. Chlamydomonas reinhardtii und Haematococcus vulgaris wachsen auch im S-Mangel gut (ca. 20 % der Sulfatwerte bezogen auf Proteinbasis), während besonders Chlorella fusca 211-8b fast vollständig das Wachstum einstellt (1 %).
Die spezifische Aktivität der Cysteinsynthase wird bei Euglena gracilis, Chlorella sorokiniana und Scenedesmus obliquus in gleicher Weise wie bei Chlorella fusca 211-8b durch Schwefelmangel deutlich erhöht. Bei Chlamydomonas reinhardtii, Haematococcus vulgaris, Scenedesmus armatus subalternus und S. commi hat S-Mangel keinen Einfluß auf die Cysteinsynthase. Die Daten zeigen zudem, daß Chlorella fusca 211-8b neben Chlorella kessleri 211-11h die höchste spezifische Aktivität der Cysteinsynthase besitzt und somit ein gut geeigneter Organismus zur Isolierung dieses Enzyms darstellt.

Die L-Cysteindesulfhydrase, deren Existenz als eigenes Enzym nach 3.7.4 angezweifelt wird, zeigt prinzipiell keine großen Umsätze, wobei Chlorella saccharophila die höchste Aktivität auf Sulfatmedium aufweist. S-Mangel erhöht besonders bei den Chlorella-Arten die Enzymaktivität.
Die D-Cysteindesulfhydrase liefert meist etwas höhere Werte, wobei hier Chlorella fusca 211-8b auf Sulfatmedium die höchste Aktivität besitzt. S-Mangel steigert stets das Enzym.
Die höchste Thiosulfatreduktaseaktivität wird bei Chlorella sorokiniana beobachtet. S-Mangel bewirkt bei Chlorella fusca 211-8b (100 fach), Scenedesmus-Arten und Euglena gracilis eine deutliche Enzymsteigerung , während Chlorella sorokiniana und Chlamydomonas reinhardtii die Aktivität hemmen.

Die Glutaminsynthetase besitzt in Chlorella sorokiniana den höchsten Wert beim Wachstum auf Sulfat. S-Mangel kann bei Chlorella fusca 211-8b und Scenedesmus armatus subalternus zu stark gesenkten, bei Chlorella sorokiniana zu erhöhten Aktivitäten führen. Euglena gracilis und Chlamydomonas reinhardtii reagieren kaum auf S-Mangel.
Chlorella fusca 211-8b stellt einen besonders geeigneten Organismus zum Studium der genannten Enzyme dar, da meist gut meßbare spezifische Aktivitäten auftreten. Zum Vergleich scheint Chlorella sorokiniana bei ähnlichen Enzym-

werten nützlich zu sein, da seine Thiosulfatreduktase und Glutaminsynthetase ein konträres Verhalten bei S-Mangel zeigen.

3.4.4.3 Regulation bei Lemna minor

Während beim Wachstum von Algen die Protein- und Chlorophyllmenge ein Maß des Wachstums ist, bereiten diese Werte bei Lemna Schwierigkeiten (Tab. 23), da nur eine kleine Zahl an Gliedern zum Wachstumsbeginn eingesetzt werden kann, und somit wegen der Vorbildung von Tochtergliedern starke Schwankungen bedingen. Aus diesem Grunde werden diese Daten nicht in Tab. 23 aufgeführt. Um den Kurzzeiteinfluß der Verbindung auf die Regulation der Enzyme verfolgen zu können, wurden deren Aktivitäten nach 12 und 24 Stunden beobachtet, um Werte unter steady-state-Bedingungen zu erhalten.

Tab. 23 : Regulation bei Lemna minor

Schwefelverbindung im Medium	Konzentration	12 Stunden Wachstum				24 Stunden Wachstum			
		CS	SCS	TSR	GS	CS	SCS	TSR	GS
Sulfat	0,3 mM	2,25	157	154	138	1,46	207	156	61
Thiosulfat	0,3 mM	2,11	124	157	98	[illegible]	218	243	163
Glutathion	0,3 mM	2,14	293	192	133	1,53	[illegible]	156	41
D-Cystein	0,3 mM	2,86	f	320	167	[illegible]	[illegible]	430	148
L-Cystein	0,1 mM	2,97	430	184	141	[illegible]	[illegible]	180	156
	0,3 mM	3,50	206	142	117	3,40	95	162	190
	0,6 mM	2,41	164	159	70	1,82	77	93	110
	1,0 mM	2,24	176	154	126	1,77	107	95	104
L-Cystein/L-Methionin	0,3/0,3 mM	2,40	160	77	45	3,44	320	241	147
L-Methionin	0,3 mM	2,77	80	74	137	3,25	136	167	155

Lemna minor wurde bei 25°C und Dauerlicht (5000 Lux) auf den genannten Schwefelverbindungen mit dem unter 2.1.3 beschriebenen Schwefelmangelmedium angezogen. Nach dem Abseien der Lemnen wurden diese mit dem zweifachen Volumen (v/w) an Extraktionspuffer, der aus 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 2 mM Magnesiumchlorid und 0,1 M Kaliumchlorid bestand in einem Potter homogenisiert und 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Abkürzungen :

CS = Cysteinsynthase (µmol Cystein x mg Protein^{-1} x h^{-1}); SCS = S-Sulfocysteinsynthase (nm "Cystein" x mg Protein^{-1} x h^{-1}); TSR = Thiosulfatreduktase (nmol Sulfid x mg Protein^{-1} x h^{-1}); GS = Glutaminsynthetase (µmol umgesetztes Glutamin x mg Protein^{-1} x h^{-1}). f = Daten fehlen.

Nach 12 Stunden kann für die Cysteinsynthase keine signifikante Änderung gemessen werden. Erst nach 24 Stunden treten deutliche S-Mangelsymptome auf, die sich für die Cysteinsynthase in erhöhten Enzymwerten gegenüber der Sulfatkultur zeigen. Während die Sulfat- und Glutathionkultur abnehmende Enzymaktivität aufweisen, ändert sich bei der Thiosulfatkultur nichts. Ansätze mit niedrigen L-Cysteinmengen, D-Cystein, L-Methionin und L-Cystein/L-Methionin

haben erhöhte Enzymwerte zur Folge. Hohe L-Cysteinmedien senken dagegen die Aktivität. Die 28-Stunden Kulturen (Tab. 24) zeigen das gleiche Verhalten, wobei L-, D-Cystein und L-Methionin S-Mangel andeuten. Besonders hervorzuheben ist, daß die Rohextrakte von Lemna-Kulturen, die auf L- bzw. D-Cystein gewachsen sind, hohe Nullwerte beim Cysteinsynthasetest (2.5.1) aufweisen, auf deren chemische Natur unter 3.6.1.1 näher eingegangen werden soll. Es handelt sich dabei um Gaitonde-positive Verbindungen (3.3.1.2.1).

Tab. 24 Regulation bei Lemna minor

S-Quelle	Konzentration	Prot.	CS	L-CD	D-CD	TSR	GS	Cys	RD
Sulfat	0,3 mM	19,2	239	77	17	29	1,41	99	69
L-Cystein	0,3 mM	14,1	531	102	33	182	0,58	571	92
D-Cystein	0,3 mM	13,8	493	99	32	311	0,65	721	188
L-Methionin	0,3 mM	27,0	532	56	33	35	3,32	14	45

Die Kulturen wurden wie in Tab 22 angezogen, abgeerntet und auf Enzymaktivitäten untersucht.

Prot. = Gesamtprotein (mg); CS = Cysteinsynthase (nmol Cystein x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1});
L-CD = L-Cysteindesulfhydrase (nmol Sulfid x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1}); D-CD = D-Cysteindesulfhydrase (nmol Sulfid x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1}); TSR = Thiosulfatreduktase (nmol Sulfid x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1});
GS = Glutaminsynthetase (µmol umgesetztes Glutamin x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1}); Cys = Cystein-Nullwert des Testes 2.5.1 (nmol Cystein x mg Protein); RD = Rhodanese (Test nach 2.5.9; nmol Thiocyanat x mg Prot.$^{-1}$ x h^{-1}). Die Zellen wurden 28 Stunden mit den genannten Verbindungen inkubiert.

Die L-Cysteindesulfhydrase wird nach 28 Stunden durch D- und L-Cystein erhöht. Die D-Cysteindesulfhydrase ist unter gleichen Bedingungen weniger aktiv und weist für D-,L-Cystein und L-Methionin höhere Werte auf. Die Rhodanese wird besonders durch D-Cystein stimuliert.
Die Thiosulfatreduktase weist nach 12 Stunden nur für D-Cystein einen erhöhten und für L-Methionin bzw. L-Cystein/L-Methionin erniedrigte Werte auf. Nach 24 Stunden besitzt die D-Cysteinkultur immer noch erhöhte Enzymaktivität. Die Thiosulfatkultur zeigt das gleiche Verhalten, während L-Cystein (über 0,3 mM) die Reaktion hemmt. Auch die 28-Stunden-Kulturen zeigen ähnliche Ergebnisse, die für L-, D-Cystein und L-Methionin auf S-Mangel hindeuten.

Die S-Sulfocysteinsynthaseaktivität kann wie bei Chlorella (3.7.5) eine Kettenreaktion von Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase und nicht ein einziges Enzym sein. Erhöhte Werte beobachtet man nach 12 Stunden für Glutathion und niedrige L-Cysteinmengen. Nach 24 Stunden zeigen D-Cystein und L-Cystein/L-Methionin das gleiche Verhalten, hemmen L-Methionin nach 12 Stunden und L-Cystein (über 0,3 mM) nach 24 Stunden das Enzym. Die Ergebnisse für die Glutaminsynthetase sind widersprüchlich. Nach 24 Stunden führt L-Methionin bzw. L-Cystein/L-Methionin zu erhöhten Enzymwerten, während Glutathion das Enzym hemmt. D- und L-Cystein liefern keine eindeutigen Ergebnisse.

Die Lemna-Kulturen zeigen z.T. das von Chlorella fusca 211-8b bekannte Verhalten. Zudem sind sie wegen der Bildung von Gaitonde-positiven Verbindungen beim Wachstum auf L- bzw. D-Cystein von Interesse.

3.4.5 Diskussion

3.4.5.1 Allgemeine Überlegungen

Im Folgenden sollen nur einige Grundprinzipien herausgearbeitet werden, die die bei den Regulationsversuchen gewonnenen Ergebnisse zum Teil erklären könnten. Es besteht nicht die Absicht, jeden Enzymwert für jede Schwefelquelle erklären zu wollen, da eine Vielzahl von Einflüssen, die zu den beobachteten Daten führten, in Betracht gezogen werden müssen. Die dabei in vivo vermuteten Wirkungen der verwendeten Schwefelquellen müssen in vitro an aufgereinigten Enzymen oder Membranfraktionen demonstriert werden, was den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hat, um zu eindeutigen Aussagen zu kommen. Deshalb wird versucht, die angenommenen Wirkungswege anhand der Literatur zu belegen.

3.4.5.1.1 Auswahl der Verbindungsklassen

Die eingesetzten Verbindungen wurden nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgewählt :

1. Da aus der Literatur die Wirkung wichtiger biogener schwefelhaltiger Verbindungen z.T. bekannt ist, wurde diese Stoffgruppe, zu der z.B. L-Cystein D-Cystein, L-Methionin und Cystathionin gehören, besonders ausführlich untersucht.
2. In diesem Zusammenhang war es von Interesse, das Wachstumsspektrum von Blau- und Grünalgen kennenzulernen, was durch Reduktion und Oxidation biogener Verbindungen geschah. Hier wäre z.B. die Reihe L-Cystein, L-Cysteinsulfinsäure, L-Cysteinsäure und S-Sulfo-L-Cystein zu nennen.
3. Zudem sollten einige nur im Labor vorkommende Substanzen, wie DTNB oder Thioacetamid sowie industrielle Abfallsprodukte untersucht werden, wobei besonders Ligninsulfonsäure zu nennen wäre.

Im Einzelnen handelt es sich dabei um folgende Substanzklassen, wobei strukturähnliche Verbindungen,sei es nur eine Verlängerung um eine $-CH_2$-Gruppe oder eine Oxidation der Thiolgruppe, durch Bindestriche hervorgehoben werden :

anorganische Schwefelsalze : elementarer Schwefel, Eisensulfid, Thiocyanat, Thiosulfat, Tetrathionat.

Sulfatester : Aminoathylhydrogensulfat, SDS.

Thioester : Homocysteinthiolacton.

Thioamide : Thioharnstoff, Thioacetamid.

Thiaminderivate : Thiamin, Sulfathiazol.

Mercaptide : Äthanthiol - Äthandithiol - Propanthiol, Mercaptoäthanol - Mercaptoäthansulfonsäure - Mercaptopropionsaure, Mercaptopyruvat, Thioessigsaure - Thioglykolsäure - Thioglycerin, BAL - DTE - GSH, Cystein - N-Acetylcystein - Cysteinmethylester - Cysteinäthylester - Homocystein - Cysteamin, Thiocresol, Thiosalicylsäure.

Disulfide : Cystin - Homocystin - Cystamin - Cystathionin, Liponsäure, DTNB, GSSG, Cystindimethylester - Cystindiäthylester.

Thioäther : Äthylmercaptoäthanol - Methyl-methylthiomethylsulfoxid - Methylmercaptopropionaldehyd, α-Keto-γ-Methiolbutyrat, Dimethylsulfid - Thiodiglycolsäure, S-Methylcystein - S-Äthylcystein - S-Benzylcystein, S-Carboxymethylcystein - S-Carboxyäthylcystein - S-Carbamoylcystein, Methionin - Methioninamid - Methioninol - S-Methyl-Methionin - Äthionin, Lanthionin - Djenkolsäure, Tetrahydrothiophen - Tetrahydro-4H-thiopyran, Thiazolidin-4-carbonsäure, Biotin.

Sulfinsäuren : Formamidinsulfinsäure , Cysteinsulfinsäure, Benzolsulfinsäure, Toluolsulfinsäure.

Sulfone : Dimethylsulfon, 2,2-Thiodiessigsäuresulfon, Sulfolan, Methioninsulfon, Benzolsulfonamid, Sulfanilsäure.

Sulfonsäure : Sulfaminsäure , Methansulfonsäure, Äthansulfonsäure - Äthandisulfonat, Aminomethansulfonsäure - Taurin - 3-Amino-1-propansulfonsäure, Mercaptoäthansulfonsäure - Hydroxyäthansulfonsäure, Sulfoessigsäure - Sulfopropionsäure, Cysteinsäure - Homocysteinsäure, Glutathionsulfonsäure, Ligninsulfonsäure, Benzolsulfonsäure - Phenolsulfonsäure - Toluolsulfonsäure - Sulfanilsäure - Orthanilsäure - Sulfosalicylsäure - Sulfobetain, "Good" Puffer: MES, BES, TES, TAPS - TAPSO, DIPSO, MOPS - MOPSO, HEPES - HEPSO, POPSO.

Sulfoxide : Dimethylsulfoxid (DMSO), Methylmethylthiomethylsulfoxid, S-Methylpropionsäuresulfoxid, Äthylmercaptoäthanolsulfoxid, 2,2-Thiodiessigsäuresulfoxid, Methioninsulfoxid.

Die Sulfatester wurden nur mit zwei Vertretern untersucht, da bekannt ist, daß Bakterien wie Comamonas (MATCHAM et al. 1977) und wahrscheinlich auch Algen extracelluläre Sulfatasen besitzen, die diese Verbindungen schon im Medium spalten.

Die Konzentration der eingesetzten Verbindungen wurde zu 3×10^{-4} M gewählt, da höhere Konzentrationen das Wachstum unterbinden. L-Cystein hemmt z.B. in 1 mM Konzentration den mit seinem eigenen Stoffwechsel eng verbundenen Threoninstoffwechsel stark, was jedes Wachstum unterbindet. Dabei werden hauptsächlich die Threonindehydratase und -deaminase , wie dies von Escherichia coli (HARRIS 1981) und Ratten (DI STEFANO et al. 1978), sowie der Threoninsynthetase von höheren Pflanzen (MADISON und THOMPSON 1976) bekannt ist, gehemmt.

3.4.5.1.2 Einfluß des Mediums

Will man die Wirkung verschiedener Schwefelquellen auf einzelne Enzyme diskutieren, so darf man den Einfluß des Mediums nicht unterschätzen, der auf 3 Hauptwirkungen beruhen kann:

1. Ein Teil der verwendeten Schwefelquellen wurde als Festsubstanz ins Medium gegeben, da ihr Löslichkeitsprodukt unter den gewählten Bedingungen z.T. überschritten wurde. Bei diesen Substanzen lag somit nicht die Standardkonzentration von 3×10^{-4} M, sondern eine für jede Verbindung spezifische Konzentration vor, die durch das Löslichkeitsprodukt bestimmt wurde. Während des Wachstums der Algen unter "batch-Bedingungen" löste sich stets Substanz nach, so daß über längerere Zeit als bei einer Standardkonzentration von flüssigen Verbindungen, die Substanz zum Wachstum zur Verfügung stand. Somit können die Ergebnisse der als Lösung zugesetzten Verbindungen nicht mit den Festsubstanzen ohne Vorbehalt verglichen werden. Dies trifft z.B. auf Cystein (flüssig) und Cystin (fest) zu. Es sei noch erwähnt, daß die Festsubstanzen nicht steril zugegeben werden konnten.

2. Besonders muß bedacht werden, daß alle Versuche als batch-Kultur durchgeführt wurden. Es ist daher anzunehmen, daß die Konzentration der angebotenen Schwefelquellen im Lauf des Wachstums abnahm und zudem andere Verbindungen von den Algen ausgeschieden worden sein können. Diese Veränderung des Mediums konnte als Alkalisierung (Abb. 24) beobachtet werden, die bei Chlorella in der stationären Phase zur Verklumpung der Zellen führt. Der Anstieg des pH-Wertes über 9,5 beim Wachstum von Chlorella auf Sulfatmedium erhöht die Elastizität der Mutterzellenmembran, so daß die Reifung der Autosporen innerhalb der Mutterzelle erfolgt. Dabei wird nach ARAD et al. (1980) die Elastizitätssteigerung durch erhöhte Cellulaseaktivitäten bewirkt. Die Autosporen bleiben auch nach Sprengen der Mutterzelle über deren Membranreste verbunden und bilden ihrerseits Autosporen, so daß allmählich große Zellcluster entstehen, die zum einen die Zellzahlbestimmung erschweren, zum anderen zur Anheftung der Zellen an die Kulturgefäßwand der 10 l Flaschen führen, so daß die Wachstumsdaten in Abb. 25 z.B. nach 5 Tagen nicht richtig ermittelt werden konnten.
Zudem ist es nicht leicht, die Wirkung der von den Kulturen ausgeschiedenen Verbindungen auf die Aufnahme, den Metabolismus und die Enzyme selbst abzuschätzen.

3. Ein weiterer Störfaktor kann die Belüftung der Kulturen sein. Die verwendete Anlage erlaubte keine genaue Luftdurchflußkontrolle, so daß nicht in allen

Pirson-Flaschen gleiche Verhältnisse vorgelegen haben können.
Der Eintrag von Sauerstoff könnte auch zu einer chemischen Oxidation der eingesetzten Schwefelquellen führen. Dabei spielen die Metallionen der Spurenelementelösung eine besondere Rolle. Aus der Literatur liegen mehrere Arbeiten vor, die eine Thioloxidation in Gegenwart von Metallionen beschreiben. Dabei sind besonders Eisen-(III)- und Kupfer-(II)-ionen zu nennen, deren Einfluß auf die Oxidation von Cystein (3.3.1.5) zu Cystin ausführlich abgehandelt wurde. Zudem konnte bei den Versuchen zur Bildung von elementarem Schwefel (3.5.5) auch kurz nach Zugabe von Cysteinäthylester oder Cystein zum Medium allein Schwefelwasserstoff nachgewiesen werden, der aus diesen Verbindungen stammte. Diese Beobachtung wird näher untersucht (3.5.5). Da das Medium aber auch EDTA, welches Metallionen komplexieren kann, enthält, ist der Grad der Oxidation von Thiolen nur schwer abschätzbar. Angesichts der Fülle der eingesetzten Schwefelquellen war es nicht möglich, eine Veränderung durch Oxidation oder enzymatische Reaktionen zu überprüfen.

3.4.5.1.3 Einfluß von Aufnahme und Metabolismus der Schwefelquellen

Während die Einflüsse des Mediums z.T. noch in vitro ohne Algen nachvollziehbar sind und somit eine Kausalanalyse zu abgesicherten Erklärungen führen kann, ist man bei der Diskussion der Aufnahmephänomene der eingesetzten Verbindungen und deren Wirkung auf die Sulfataufnahme weitgehend auf Vermutungen angewiesen. Eine experimentelle Überprüfung gestaltet sich schon deshalb schwierig, da stets die Wirkung des Mediums und der Metabolismus der Verbindungen von Bedeutung sein können.
Die Untersuchungen ohne Sulfatzugabe liefern gute Hinweise zur Aufnahme der jeweiligen Verbindung. Zeigen die Kulturen gutes Wachstum, so ist anzunehmen, daß sie die angebotene Verbindung gut aufnehmen. Dafür sind zwei Erklärungsmöglichkeiten denkbar : Zum einen könnte es ein für diese Verbindung spezifisches Transportsystem (Permease) geben, zum anderen könnte die Verbindung von anderen Transportsystemen wegen deren Unspezifität in die Zellen gebracht werden, was besonders für nicht biogene Substanzen von Bedeutung sein dürfte. In diesem Zusammenhang sei noch an den Einfluß des pK-Wertes und damit an das Vorliegen einer ionischen Form erinnert, die für diesen Prozeß von großer Wichtigkeit ist.
Ein schlechtes Wachstum wird allgemein als S-Mangel bezeichnet, d.h. die verwendete S-Quelle wird nur sehr langsam metabolisiert. Dies kann dagegen nicht nur auf ein schlechtes eigenes oder fremdes Transportsystem, sondern

auch auf eine "feedback"-Hemmung zurückzuführen sein, wobei nicht nur die Verbindung selbst,sondern auch deren Metabolite in Erwägung gezogen werden müssen. Ob es sich dabei um eine Repression oder Inaktivierung des Aufnahmesystems handelt, muß offen bleiben. Es ist durchaus denkbar, daß eine Verbindung aufgenommen wird,aber nur bis zu einer gewissen Stufe metabolisiert werden kann, die den Schwefel nicht für die Biosynthese von Cystein oder Methionin liefern kann, so daß ebenfalls ein S-Mangel entsteht.
Bei Langzeit-Sulfatzugabe (5 Tage) zu den Schwefelquellen sollten Verbindungen erkennbar sein, die die Sulfataufnahme beeinflussen. Dazu können solche Verbindungen Hinweise liefern, die das Wachstum mit und ohne Sulfat hemmen, oder allein normales Wachstum zeigen, bei Sulfatzugabe aber hemmend wirken.
Besonders vorteilhaft sind Kulturen, die erst 3 Tage auf Sulfat gewachsen waren und zusätzlich für weitere 24 Stunden ein oder mehrere S-Quellen zugesetzt bekamen. Dieser kurze Zeitraum reicht einerseits zur Gleichgewichtseinstellung aus,andererseits kann wegen der vorherigen Schwefelversorgung kein S-Mangel auftreten, und so eine direkte Enzymregulation erkannt werden. Bei den Langzeitversuchen unter Standardbedingungen muß das Entstehen eines S-Mangels stets mit berücksichtigt werden.

3.4.5.1.4 Enzymregulation in vivo

Ziel der dargestellten Versuche dieses Kapitels war es, die Regulation der gemessenen Enzyme aus in vivo Daten ableiten zu können.
Ein Großteil der Substanzen zeigt gleiches Wachstum und gleiche Enzymaktivitäten wie die auf Sulfat gezogene Standardkultur. Diese wird als Bezugskultur herangezogen, da Sulfat das häufigste schwefelhaltige anorganische Ion in aquatischen Systemen darstellt. Alle Werte, die innerhalb des Konfidenzintervalles von 67 % , d.h. im Bereich $\pm \sigma$, liegen, gelten als Normalwerte, die über- oder unterhalb liegen sind signifikant verschieden.
Bei der weiteren Diskussion muß die Herkunft der Ergebnisse näher spezifiziert werden. Wenn von Standardbedingungen (S) die Rede ist, so wird darunter bei Chlorella ein fünftägiges und bei Synechococcus ein viertägiges Wachstum auf der genannten S-Quelle verstanden. Bei einer exponentiellen Kultur (E) von Chlorella wuchsen die Zellen vier Tage auf einer schwefelhaltigen Verbindung. Kurzzeitbedingungen (K) herrschen bei Kulturen, die drei Tage nur auf Sulfat wuchsen und denen anschließend für weitere 24 Stunden S-Quellen zugesetzt wurden.

Prinzipiell können aus den Versuchen unter Standardbedimgungen eindeutige Hinweise auf eine spezielle Aktivierung oder Hemmung gezogen werden, indem Wachstum und Enzymaktivierung mit und ohne Sulfat gleiches Verhalten zeigen, obwohl auch Aufnahme- und Metabolisierungseinflüsse zu den gleichen Ergebnissen führen könnten.
Beobachtet man bei Kulturen mit geringem Wachstum und erhöhter bzw. erniedrigter Enzymaktivitäten nach Sulfatzugabe normalisiertes Wachstum und normale Enzymaktivität, so handelt es sich in fast allen Fällen um Schwefelmangel, der durch eine schlechte Aufnahme oder unzureichende Metabolisierung hervorgerufen sein kann, durch Sulfatzugabe aber aufgehoben wird.

Im Einzelnen sind von den 8 Gruppen bei alleinigem Wachstum auf einer S-Quelle nur folgende Kombinationen nach Sulfatzugabe aussagekräftig, wobei A und B nur Aussagen bezüglich des Wachstums, der Aufnahme und Metabolisierung, nicht aber der Enzymregulation ermöglichen. Die Gruppen C - H zeigen die Einflüsse auf Wachstum und Enzym, die in den genannten Fällen Rückschlüsse auf die Enzymregulation zulassen.

A : A_1 Beobachtet man bei einer Verbindung vor und nach Sulfatzugabe erhöhtes Wachstum bei normalen Enzymwerten, so muß diese Substanz leicht metabolisiert werden.

A_2 Zeigt sich dagegen bei Kulturen mit erhöhtem Wachstum nach Sulfatzugabe ein normales Wachstum, könnte eine Repression der Aufnahme oder Metabolisierung vorliegen.

B : B_1 Wir dagegen ein geringes Wachstum bei normalem Enzym auch nach Sulfatzugabe beobachtet, dürfte die Aufnahme oder Metabolisierung der S-Quelle gehemmt sein.

B_2 Erhöht Sulfatzugabe das Wachstum bei normalen Enzymaktivitäten zu Normalwerten, so stellt Sulfat eine besser verfügbare S-Quelle dar.

C : C_1 Kann bei erhöhtem Enzym und normalem Wachstum nach Sulfatzugabe keine Veränderung beobachtet werden, so muß die S-Quelle eine Aktivierung des Enzyms bewirken.

C_2 Steigert Sulfatzugabe das Wachstum bei erhöhtem Enzym , so kann auf einen Additionseffekt von S-Quelle und Sulfat geschlossen werden.

D : D_1 Erhöhtes Wachstum und gesteigerte Enzymaktivität sind ein Zeichen einer spezifischen Aktivierung.

D_2 Wenn ein normales Wachstum nach Sulfatzugabe beobachtet wird, wäre eine feedback - Hemmung der Aufnahme denkbar.

E : E_1 Führt eine S-Quelle zu niedrigem Wachstum aber erhöhtem Enzym, die bei Sulfatzugabe Normalwerte ergeben, so liegt normalerweise ein Schwefelmangel vor.

E_2 Ändert Sulfatzugabe geringes Wachstum und erhöhtes Enzym nicht, dürfte eine spezifische Hemmung der Aufnahme vorliegen, die zu einem S-Mangel führt.

E_3 Ergibt dagegen Sulfatzugabe normales Wachstum bei weiterhin erhöhtem Enzym, muß auf eine spezifische Aktivierung des Enzyms geschlossen werden.

F : F_1 Eine spezifische Hemmung des Enzyms liegt dann vor, wenn vor und nach Sulfatzugabe normales Wachstum und niedrige Enzymwerte gemessen werden.

F_2 Kann das Wachstum durch Sulfat bei weiterhin geringem Enzym erhöht werden, ist an einen Additionseffekt zu denken.

G : G_1 Schlechtes Wachstum und niedriges Enzym, welche durch Sulfat nicht gesteigert werden können, sind auf eine spezifische Hemmung des Enzyms und eine schlechte Metabolisierung der Verbindung zurückzuführen.

G_2 Erhöht dagegen Sulfatzugabe nur das Wachstum bei niedrigem Enzym, liegt ebenfalls eine spezifische Hemmung des Enzyms vor.

H : H_1 Beobachtet man bei gutem Wachstum niedrige Enzymaktivitäten, die durch Sulfat nicht beeinflußt werden, so liegt eine spezifische Hemmung und Metabolisierung der S-Quelle vor.

H_2 Wird dagegen normales Wachstum bei weiterhin gehemmten Enzym nach Sulfatzugabe gemessen, liegt allein eine Enzymhemmung vor.

Es sei nochmals erinnert, daß der Gebrauch der Ausdrücke "Hemmung" und "Aktivierung" in diesem Kapitel keine Beschreibung des direkten Wirkungsmechanismusses der zugesetzten Verbindung bedeutet, da dies nicht aus den Versuchen geschlossen werden kann.

Die oben genannte Interpretation der Daten ist prinzipiell auch auf das exponentielle Wachstum anzuwenden, wenngleich hier wegen der fehlenden Sulfat plus S-Quellen-Daten keine Differenzierung möglich ist.

Die Interpretation der Kurzzeitversuche ist dagegen erheblich einfacher und direkter. Während die Kulturen unter Standardbedingungen bereits in der späten

exponentiellen Phase sind und sich ein stark alkalischer pH-Wert des Mediums eingestellt hat, was zu vielfältigen Wirkungen führt, müssen diese Einflüsse bei Kurzzeitbedingungen der noch linear logarithmisch wachsenden Kulturen kaum berücksichtigt werden. Zudem bilden sich in der kurzen Zeit weniger Metabolite die ihrerseits die Enzyme beeinflussen könnten, so daß die Regulation der Enzyme direkt auf die zugesetzte S-Verbindung zurückgeführt werden kann. Ergänzend sei noch erinnert, daß die eingesetzten S-Quellen oft nicht nur als S-Quelle, sondern auch als C- und N-Quelle dienen können, so daß Wechselwirkungen zwischen S,N und C-Gehalt auftreten, auf die in der Gesamtdiskussion (4.1) eingegangen werden soll.
Beim Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen aus der Literatur bekannten, werden nur die von höheren Pflanzen, Algen, Blaualgen, phototropen Bakterien und nur in besonderen Fällen von Tieren, Pilzen und Bakterien herangezogen. Dabei ist zu beachten, daß bei der assimilatorischen Sulfatreduktion zum Cystein hin zwei unterschiedliche Wege über APS allein oder zusätzlich PAPS erfolgen, und somit die Ergebnisse nicht vergleichbar sind. APS ist ein Zwischenprodukt der Sulfatreduktion bei höheren Pflanzen, Grünalgen und einigen Blaualgen und phototropen Bakterien, während viele Blaualgen und phototrope Bakterien PAPS als Substrat der PAPS-Sulfotransferase verwenden. Die Befunde der beiden Gruppen sind daher nur bedingt vergleichbar.

3.4.5.2 Wachstum, Aufnahme und Metabolismus der S-Quellen

Die besten Hinweise über das gesamte Zusammenspiel von Aufnahme, Metabolismus und Regulation der Enzyme durch die zugesetzte S-Quelle liefern die Wachstumsdaten, für die das Gesamtchlorophyll als Maßstab herangezogen wurde. Als Bezugswerte gelten die der Sulfatkultur. Die Ergebnisse der phototropen Bakterien können nicht mit denen der anderen pflanzlichen Systeme verglichen werden, da einige Arten nicht auf Sulfat wachsen und somit kein Bezugswert vorliegt.
Betrachtet man den zeitlichen Verlauf des Wachstums von Chlorella fusca auf Sulfat (Abb. 25), so verhält sich die pH-Änderung des Mediums und die Zellzahlzunahme ähnlich wie bei Chlorella vulgaris (SOLDATINI et al. 1978). Diese Autoren zeigten auch, daß die Sulfatkonzentration unseres Mediums (0,2 mM) für Chlorella optimal ist. Die Zellen befinden sich nach 4 Tagen in der linear logarithmischen, nach 5 Tagen in der späten exponentiellen Phase, wobei der pH-Wert nach 3 Tagen drastisch alkalisch wird. Deshalb müssen auch schon bei Kurzzeitbedingungen pH-Effekte berücksichtigt werden.

Schwefelmangel fördert nur in der ersten Zeit das Wachstum, was aber durch geringe Restsulfatmengen in den Zellen bedingt sein könnte. Der pH-Wert ändert sich deshalb auch nicht merklich. Auch alle anderen Grünalgen (Tab. 22), Blaualgen wie auch Synechococcus 6301 (Tab 21) weisen bei S-Mangel geringes Wachstum auf. Diese Daten sind ebenso wie die der Sulfatkultur für die Interpretation zu Vergleichszwecken notwendig. Bei Kurzzeitversuchen könnte nach Zugabe der S-Quelle zum Sulfatmedium ein S-Mangel auftreten. Dies erscheint aber zweifelhaft, da sich in der kurzen Zeit von 24 Stunden kaum so drastische Änderungen durchsetzen können. Maisprotoplasten zeigen erst 5 Tage nach Umsetzen auf S-Mangel deutliche Gesamtchlorophyll- und Proteinabnahme (PASSERA und GHISI 1982). Ein Grund für das Erreichen der stationären Phase unserer, unter batch-Bedingungen gewachsenen, Standardkulturen könnte ebenfalls ein S-Mangel sein, wie ihn HART und FILNER (1969) bei batch-Kulturen von Tabakzellen als Sulfatabnahme bestimmten.

Wie aus den Tab. 18 und 19 hervorgeht, sind sowohl Chlorella fusca und auch Synechococcus 6301 in der Lage, eine Vielzahl von S-Quellen zum Wachstum zu benutzen, ohne Anzeichen eines S-Mangels zu zeigen. Grün- und Blaualgen müssen somit für die eingesetzten S-Quellen spezifische oder generelle Permeasen besitzen und zudem diese Verbindungen enzymatisch aufschließen können. Es sei auch noch hervorgehoben, daß industrielle Abfallprodukte wie Ligninsulfonsäure abgebaut werden können.

Normales Wachstum kann für beide Organismen auf den Anionen Thiosulfat und Tetrathionat und Thiaminderivaten wie Thiamin und Thioacetamid beobachtet werden. Mercaptide außer den Alkylthiolen können normal metabolisiert werden, wobei L- und D-Cystein und auch Mercaptoäthansulfonsäure und DTE bei Chlorella wie auch Thioessigsäure und Thioglycolsäure, zu nennen sind. Disulfide wie L-Cystin und L-Homocystin, stellen nur für Chlorella und Liponsäureamid für beide Organismen eine gute S-Quelle dar. Die Thioäther S-Methyl-L-Cystein, S-Äthyl-L-Cystein, L-Methionin, L-Methioninamid und α-Keto-γ-Methiolbutyrat werden von Chlorella gut metabolisiert, während Synechococcus dies nur bei L-Djenkolsäure kann. Chlorella wächst zudem auf L-Cysteinsulfinsäure und einer Anzahl von Sulfonsäuren, wie L-Cysteinsäure, mehreren "Good"-Puffern, aliphatischen Sulfonsäuren, wie Hydroxyäthansulfonsäure und Mercaptoäthansulfonsäure, den Strukturanaloga Taurin und 3-Amino-1-propansulfonsäure wie auch S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid und L-Methioninsulfoxid. Hingegen hemmen fast alle Sulfonsäuren außer Phenol- und Ligninsulfonsäure das Wachstum von Synechococcus vollständig.

Normales Wachstum fanden HODSON et al. (1968) bei Chlorella vulgaris für

Thiosulfat und HART und FILNER (1969) bei Tabak für Thiosulfat, Sulfit, reduziertes Glutathion, L-Cyst(e)in und L-Methionin. Die letzten beiden Verbindungen hemmen in Konzentrationen über 1 mM das Wachstum von Tabakzellkulturen.

Das erhöhte Wachstum mit und ohne Sulfatzusatz dürfte mehrere Ursachen haben, die nur durch den Sulfatzusatz differenziert werden können. Da bei einigen eigenen und den in der Literatur genannten Verbindungen dieser Versuch fehlt, sollen diese schon an dieser Stelle diskutiert werden. S-Carbamoyl-L-Cystein führt zu erhöhtem Wachstum (Tab 18). Chlorella vulgaris reagiert auf Sulfitmedium in gleicher Weise, wobei der pH-Wert des Mediums von großem Einfluß ist (SOLDATINI et al. 1978). Bei pH 7,0 liegt Sulfit hauptsächlich als $SO_2 \times H_2O$ und weniger als HSO_3^- vor, das schwerer aufgenommen werden kann, während bei pH 8,0 ein umgekehrtes Verhältnis besteht. Lemna-Kulturen wachsen auf L-Cystin besser als auf Sulfat (ELLIS 1969).

Eine Ursache für ein besseres Wachstum auf Sulfat kann ein Additionseffekt sein, der für die Gruppen C_2, F_2 und G_2 zutreffen dürfte. Ohne Sulfat weisen diese Kulturen ein geringeres oder normales Wachstum auf, so daß bei Sulfatzugabe vermehrt Schwefel der Zelle zur Verfügung steht. Eine gegenseitige Regulation der Aufnahme von S-Quelle und Sulfat scheint nicht stattzufinden.

Bei Chlorella unter Standardbedinungen tritt bei Mercaptiden, wie L-Cystein, Disulfiden, wie L-Cystin, oxidiertem Glutathion, Thioäthern, wie S-Carboxymethyl-L-Cystein, S-Carboxyäthyl-L-Cystein und S-Methylmethionin sowie bei Dimethylsulfoxid ein Additionseffekt auf.

Kurzzeitbedingungen zeigen die gleiche Tendenz, wobei Mercaptide und Disulfide und Vorläufer des Cysteins sich in Kombination ein gesteigertes Wachstum bewirken. So gehören Mercaptopyruvat, Mercaptopyruvat/L-Cystein bzw. /L-CÄE sowie L-Cystin/PSer, D-Cys/OAS bzw. /L-Methionin und L-Cys/OAS zu dieser Gruppe. Bei Synechococcus sind Djenkolsäure, D-Cystin, L-Homocystin und Sulfoessigsäure zu nennen.

Eine andere Ursache kann die spezielle Stimulierung des Wachstums sein, die sich aus den Gruppen A_1, D_1 und H_1 ableiten läßt. Dabei beobachtet man mit und ohne Sulfatzusatz stets ein erhöhtes Wachstum. Chlorella kann L-Lanthionin unter Standardbedingungen als sehr gute S-Quelle benutzen.

Als weitere Ursache ist die Hemmung der Aufnahme der zugesetzten S-Verbindungen anzusehen, die in den Gruppen A_2, D_2 und H_2 auftritt, wobei ein erhöhtes Wachstum auf der S-Quelle allein durch Sulfatzusatz zu Normalwerten reduziert wird. Dies trifft bei Chlorella unter Standardbedingungen auf die Sulfonsäuren

Sulfoessigsäure und Sulfopropionsäure und L-Cysteinsäure und bei Synechococcus auf reduziertes Glutathion zu. Aus Spinat ist nur die Hemmung der Cysteinaufnahme durch Sulfat bekannt (MUDD und deZACKS 1979).

Eine weitere Großgruppe besteht aus S-Verbindungen, die als alleinige S-Quelle das Wachstum stark hemmen. Sulfatzusatz kann nur bei einem Teil normales Wachstum bewirken, während der andere Teil unverändert geringes Wachstum zeigt. Die Ergebnisse der Literatur differenzieren nicht, so daß sie vor den eigenen Daten dargestellt werden sollen. Chlorella vulgaris zeigt auf den Thiolen, L-Cystein, L-Cystin, den Thioäthern L-Djenkolsäure und L-Methionin sowie den Sulfonsäuren Sulfo-L-Cystein und Sulfit (> 1 mM) gehemmtes Wachstum (HODSON et al. 1969). Zudem führt der Zusatz des schwefelfreien 1,2,4-Triazol unter Kurzzeitbedingungen zu einer Wachstumshemmung, wie dies auch für Salmonella beobachtet wurde (KREDICH et al. 1975). Dies kann auch bei Lemna für Schwefelwasserstoff (BRUNOLD und ERISMANN 1974) und für Methionin, Cystein, reduziertes Glutathion, S-Mangel und Cysteinsäure (ELLIS 1969) und bei Tabak für reduziertes Glutathion(1,73 mM) beobachtet werden (RENNENBERG 1981). Zudem scheiden die Tabakzellkulturen Glutathion (BERGMANN und RENNENBERG 1978), Cystin, Cystein und oxidiertes Glutathion ins Medium aus (RENNENBERG und UTHEMANN 1980).

Eine Untergruppe besteht aus Verbindungen der Gruppen B_2, E_1 und E_3, die alleine ein geringes Wachstum, aber nach Sulfatzusatz ein normales Wachstum zeigen. Dieses Verhalten wird als Schwefelmangel angesprochen. Er tritt bei Chlorella unter Standardbedingungen bei elementarem Schwefel, Eisensulfid, dem Sulfatester Aminoäthylhydrogensulfat und den Mercaptiden Propanthiol, Cysteamin und N-Acetyl-L-Cystein sowie den Disulfiden D-Cystin, D-Homocystin und oxidiertem Glutathion und den Thioäthern S-Benzyl-, S-Carboxymethyl- und S-Carboxyäthyl-L-Cystein, Djenkolsäure, L-Methionin und S-Methyl-L-Methionin auf. Auch die Sulfone Dimethylsulfon und Sulfanilamid, die Sulfonsäuren Methansulfonsäure, einigen "Good"-Puffern sowie die Strukturhomologe Sulfaminsäure, Orthanil- und Sulfanilsäure und Dimethylsulfoxid sind ebenfalls zu nennen.

Exponentielle Kulturen zeigen gleiches Verhalten für O-Acetyl-L-Serin und D-Cystin. Bei Synechococcus gehören die Disulfide D-Cystin, L-Homocystin und D-Homocystin, die Thioäther L-Methionin und α-Keto-γ-Methiolbutyrat sowie die strukturhomologen Sulfonsäuren Taurin und 3-Amino-1-propansulfonsäure, Hydroxyäthansulfonsäure und Sulfoessigsäure dazu. Diese Verbindungen können überhaupt nicht aufgenommen werden, da eine geeignete Permease fehlt und eine Diffusion nicht möglich ist. Sollte aber die Aufnahme durch spezifische oder unspezifische Transportsysteme, wie dies für Sulfit bekannt ist, das bei

Chlorella mit dem Phosphattranslocator in die Zelle gelangt (SOLDATINI et al. 1978), erfolgen, fehlen die zur Metabolisierung notwendigen Enzyme. So kommt es zum Schwefelmangel, der erst durch Sulfatzugabe aufgehoben werden kann. Unter S-Mangel ist die Sulfatpermease von Blaualgen, wie Anacystis nidulans (UTKILEN et al. 1976) und Spirulina platensis, bei Chlorella pyrenoidosa (VALLEE und JEANJEAN 1968b) und Tabakzellkulturen (SMITH 1980) signifikant erhöht (MENON und VARMA 1982). Erst wenn der Sulfatpool nach Sulfatzugabe einen gewissen Wert überschreitet, stellt dieser die Sulfatpermease ab, wie dies unter 3.4.5.3 beschrieben wird.

Die zweite Untergruppe umfaßt eine Vielzahl von Verbindungen der Gruppe B_1, E_2 und G_1, die auch nach Sulfatzusatz Wachstumshemmung bewirken. Hierbei kann an die Hemmung wichtiger Enzyme der Proteinsynthese und Energiegewinnung gedacht werden. Bei Chlorella sind unter Standardbedingungen Sulfatester wie SDS, Mercaptide wie Alkylthiole, reduziertes Glutathion, L-Cysteinäthylester und D/L-Homocystein, das Disulfid L-Cystindiäthylester, die Thioäther D-Methionin, Cystathionin und Formamidinsulfinsäure zu nennen. Synechococcus zeigt dies für DTE, L-Cysteinmethylester und -äthylester, L-Cystin, L-Cysteinsäure und Sulfanilsäure . Die anderen unter 3.4.2.1.1 und 3.4.2.1.2 genannten Verbindungen wurden nicht auf Sulfatzusatz untersucht, so daß eine Zuordnung zu den beiden Untergruppen nicht möglich ist.

Eine weitere Gruppe umfaßt Verbindungen, die allein und oft auch noch nach Sulfatzugabe kein Wachstum erlauben bzw. stark erniedrigen. Es muß sich auch hier um eine spezifische Hemmung von Enzymen handeln, da eine fehlende oder gehemmte Aufnahme und Metabolisierung nur das Phänomen des Schwefelmangels zeigen würde. Chlorella kann unter Standardbedingungen nicht auf dem Thioester Homocysteinthiolacton, dem Thiaminderivat Sulfathiazol, den Mercaptiden Thioessigsäure und BAL, auch mit Sulfat, den Thioäthern Methional und Äthionin sowie Aminomethansulfonsäure wachsen.

Synechococcus wächst ebenfalls nicht auf Sulfathiazol, L-Cysteinäthylester, Cysteamin, den Disulfiden Cystamin und L-Cystindiäthylester wie auch auf Methional, Formamidinsulfinsäure, Aminomethansulfonsäure und Glutathionsulfonsäure. Aminomethansulfonsäure dürfte als Antagonist des Glycins dessen Stoffwechsel beeinflussen.

L-Cystein verhindert bei Tabakzellkulturen (1 mM) das Wachstum, wobei das Verhältnis von Thiol- zu Disulfidgruppen gestört wird. Zudem wird in 24 Stunden nach Zugabe Cystin durch Autolyse ins Medium ausgeschieden (RENNENBERG 1981). Auch Glutathion (1,73 mM) verhindert trotz Aufnahme des

gesamten Moleküls wie auch L-Methioninsulfoximin das Wachstum von Tabak (RENNENBERG und UHTEMANN 1980). Bei Chlorella vulgaris kann reduziertes und oxidiertes Glutathion, L-Lanthionin, L-Homocystein, L-Cysteinsäure und Cystathionin nicht als S-Quelle genutzt werden (HODSON et al. 1968), während bei Chlorella fusca immer ein Wachstum beobachtet wird (Tab. 18).
Der Einfluß der S-Quellen auf einige Enzyme des N- und S-Stoffwechsels soll in den folgenden Abschnitten getrennt besprochen werden. Wie aus den letzten beiden Verbindungsgruppen erkenntlich wurde, finden auf den verschiedensten Ebenen Eingriffe in das Stoffwechselgleichgewicht statt. Da für Chlorella und Synechococcus außer den oben genannten Enzymen keine geeigneten Befunde vorliegen, sollen doch einige aus der Literatur bekannte Ergebnisse besprochen werden, um so die Bandbreite des Einflußes zu demonstrieren.
Eine Hemmmung auf Enzymebene muß in den Gruppen F_1, G_1, G_2 und H_2 vorliegen. Dabei kann die Enzymbiosynthese gehemmt sein oder der Enzymabbau durch Proteasen beschleunigt werden. Zudem können die S-Quellen oder deren Metabolite eine " feedback-" oder kompetitive oder nicht kompetitive Hemmung bewirken.

Schwefelwasserstoff hemmt auch in Gegenwart von Sulfat die Photosynthese bei Lemna (BRUNOLD und ERISMANN 1974). Dimethylsulfoxid erhöht die Plasmamembranpermeabilität bei Tabakzellkulturen, so daß ein großer passiver Efflux erfolgen kann (SMITH 1981). Reduziertes Glutathion hemmt als Endprodukt die Glutathionbiosynthese bei der Gurke (RENNENBERG und FILNER 1982). L-Methioninsulfoximin hemmt ebenfalls die Glutathionbiosynthese und zudem die Glutaminsynthetase, auf die später unter 3.4.5.9 eingegangen wird, der Gurke.
Dies führt zu einer Anhäufung von Ammoniumionen, die ihrerseits bei Spinat die Photosynthese hemmen und den Protonengradienten entkoppeln (PLATT und ANTHON 1981). Die völlige Hemmung des Wachstums von Gurken auf Cystamin, scheint durch die Hemmung der Glutathionbiosynthese bedingt zu sein (RENNENBERG und FILNER 1982). Bei Ratten hemmt Cystamin wie auch Cysteamin die γ-Glutamylcysteinsynthase, ein Enzym der Glutathionbiosynthese, irreversibel, wobei ein Angriff an der Thiolgruppe erfolgt und ein gemischtes Disulfid entsteht (GRIFFITH et al. 1977).
Eine Aktivierung auf der Enzymebene kann aus den Gruppen C_1, D_1 und E_3 abgeleitet werden. Zum einen sind eine erhöhte Enzymbiosynthese oder eine Hemmung des Enzymabbaus oder allosterische Effekte als Auslöser denkbar. In der Literatur fehlen bisher Angaben zu diesem Punkt.

3.4.5.3 Regulation der Sulfataufnahme

Aus den eigenen Versuchen unter Kurzzeitbedingungen lassen sich nur bedingt Rückschlüsse auf die Regulation der Sulfataufnahme ziehen, da eine direkte Messung der Sulfatpermease mit (^{35}S)-Sulfat unterblieb. Trotzallem werden im Folgenden die aus der Literatur bekannten Daten kurz zusammengefaßt, da ihre Kenntnis zum Verständnis des Einflusses der Schwefelverbindungen in Gegenwart von Sulfat von großem Nutzen ist.
Die Sulfataufnahme ist ein aktiver Prozeß und geschieht durch Sulfatpermeasen, die an einer Vielzahl von pflanzlichen Organismen untersucht wurden. Ihr K_m-Wert beträgt für Chlorella $1{,}2 \times 10^{-6}$ M (VALLEE und JEANJEAN 1968a). Der pH des Mediums ist von großer Bedeutung, da das pH-Optimum der Sulfatpermease bei Tabak zwischen 6,5 und 7,5 liegt. Über pH 8,5 findet keine Sulfataufnahme statt (SMITH 1976). Für die stationäre Phase des Wachstums von Chlorella auf Sulfat (Abb. 24) muß ein solcher Einfluß in Erwägung gezogen werden. Wie die Untersuchungen von CRAM (1983a,b) für Karotten zeigten, besteht ein Gleichgewicht der Sulfatpools des Mediums, des Cytoplasmas und der Vakuole, wobei bis zu 80 % des Sulfats in der Vakuole gespeichert sein können. Der Efflux aus der Vakuole über die Tonoplastenmembran und aus dem Cytoplasma über die Cytoplasmamembran ist passiv. Die Sulfataufnahme wird hauptsächlich durch die Tonoplasten- und nicht die Plasmamembran gesteuert, da diese weder von Sulfat noch von Cystein beeinflußt wird. Ein wichtiger, aber geringer Teil des Sulfats kann pH-unabhägig bei Spinat in den Chloroplasten transportiert werden, wo die Sulfataktivierung stattfindet (SPEDDING et al. 1980b). Auf die Regulation dieser Enzymkette wird im nächsten Kapitel eingegangen.

Die interne Sulfatkonzentration hemmt die Sulfatpermease nicht kompetitiv, wobei für Tabak ein K_m von 2×10^{-5}M bestimmt wurde (SMITH 1976, 1981). Die gleiche Regulation wurde auch für Chlorella pyrenoidosa (VALLEE und JEANJEAN 1968a), Bohne (WYSS und BRUNOLD 1979) und Weizen (JENSEN und KÖNIG 1982) gefunden. Schwefelmangel steigert dagegen die Sulfataufnahme bei Anacystis (JEANJEAN und BRODA 1977).
L-Cystein hemmt bei Chlorella pyrenoidosa, aber nur unter S-Mangel, die Sulfatpermease (VALLEE und JEANJEAN 1968b). Bei Tabakzellkulturen kommt es ab 0,05 mM L-Cystein zur unkompetitiven feedback-Hemmung (HART und FILNER 1969). Lemna (0,5 mM; BRUNOLD und SCHMIDT 1978) und Spinat (MUDD und deZACKS 1979) zeigen gleiches Verhalten. Bei Tabak hat auch D-Cystein eine Hemmung zur Folge (SMITH 1976). Nach SMITH (1975a) soll aber nicht L-Cystein selbst die Permease hemmen, sondern nach Überschreiten einer gewissen Cysteinkonzentration ein Abbau über Schwefelwasserstoff zu Sulfat erfolgen, das seinerseits

die Permease direkt reguliert. Auf die dabei notwendigen Enzyme wird unter 4.1 näher eingegangen.
Die Hemmung durch Mercaptoäthanol bei Tabak (SMITH 1975b, 1976) führt man auf Membraneffekte von reduzierten Thiolen zurück. Dabei werden die oxidierten Thiolgruppen des Carriers wie der Sulfatpermease durch Mercaptide reduziert und verlieren ihre Aktivität (SMITH 1976). Gleichzeitig wird der Efflux von Sulfat, L-Cystein, Glutathion und L-Methionin erhöht (SMITH 1975b). Auch HART und FILNER (1982) konnten bei Tabak eine feedback-Hemmung durch (0,1 mM) L-Homocystein beobachten. L-Methionin (0,1 mM) soll bei Chlorella pyrenoidosa (VALLEE und JEANJEAN 1968b), Tabak (HART und FILNER 1969), Kartoffel (MAGGIONI und RENOSTO 1977) und Gerste (FERRARI und RENOSTO 1972) eine feedback-Hemmung bewirken.
Die Sulfataufnahme wird bei Chlorella vulgaris (2 mM; HODSON et al. 1971) durch Thiosulfat nicht beeinflußt, was aber im krassen Gegensatz zu den Ergebnissen für Chlorella pyrenoidosa (0,1 mM; VALLEE und JEANJEAN 1968a), Anacystis nidulans (0,01 mM; UTKILEN et al. 1976) sowie Tabak (0,1 mM; SMITH 1976) steht, die eine kompetitive Hemmung aufweisen.
Die Sulfatpermease wird durch Schwefelwasserstoff bei Chlorella pyrenoidosa (0,1 mM; VALLEE und JEANJEAN 1968a), Tabak (0,1 mM; SMITH 1976), Spinat (SPEDDING et al. 1980b) und Lemna (6µM; BRUNOLD und ERISMANN 1974) nicht kompetitiv gehemmt. Auch hier ist der pH-Wert des Mediums für die Aufnahme wichtig, da bei pH 7,0 $H_2S \times H_2O$ und kaum HS^- vorliegt, wobei ersteres besser aufgenommen werden kann. Bei pH 8,0 liegen umgekehrte Verhältnisse vor (SOLDATINI et al. 1978).

3.4.5.4 Regulation der ATP-Sulfurylase und APS-Sulfotransferase

Bei der Bestimmung der Sulfataktivierung wurde die Enzymkette vom Sulfat bis zum säurelabilen Sulfit erfaßt. Bei allen höheren Pflanzen, Grünalgen und einigen Blaualgen sind daran die ATP-Sulfurylase und APS-Sulfotransferase beteiligt. Blaualgen, wie Synechococcus, und Bakterien benötigen dazu ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und PAPS-Sulfotranferase. Um die eigenen Ergebnisse, die die oben genannten Enzyme umfassen, mit denen der Literatur vergleichen zu können, müssen die entsprechenden Enzyme als Komplex betrachtet werden, sofern entsprechende Ergebnisse vorliegen.
Da die eigenen Untersuchungen beide Enzyme nur als Summe bestimmten, soll nur auf die wichtigsten wie Cystein, Cystin, Schwefelwasserstoff und S-Mangel eingegangen werden. Das Verhalten von Chlorella bei S-Mangel in der Kinetik (Abb. 27) zeigt das allgemein bekannte Verhalten, das eine Steigerung der

Sulfataktivierung aufweist. Für Tabak (TRINITY et al. 1980) ist dies für beide Enzyme bekannt. Bei Mais liegt nur eine Zeitkinetik der ATP-Sulfurylase (PASSERA und GHISI 1982) und für Lemna minor eine für die APS-Sulfotransferase vor (BRUNOLD und SCHMIDT 1978), die gleiches Verhalten zeigen.

Das von Abb. 27 abweichende Verhalten der Sulfataktivierung unter Standardbedingungen (Tab. 18) kann bisher nicht erklärt werden. Beim Wachstum auf OAS und Phosphoserin herrscht auch S-Mangel, wie er auch bei Rhodopseudomonas globiformis (IMHOFF et al. 1981) beobachtet wurde.
Die Verbindungen, die einen S-Mangel bewirken, steigern die Enzyme meist in vitro nicht selbst, sondern regulieren sie nur durch ihre schlechte Aufnahme und Metabolisierung. Bei schlecht umsetzbaren S-Quellen wird eine "de novo Synthese" der Enzyme angenommen (SCHWENN et al. 1979; REUVENY und FILNER 1977).
Eine Steigerung der Sulfataktivierung wird bei Chlorella bei Mercaptiden, wie Mercaptopyruvat (E), L-Cysteinmethylester (K) und L-Cystein (K), Disulfiden , wie L-Cystin (E), D-Cystin (K).und Thioäthern, wie S-Methyl-L-Cystein (K) und L-Methionin (S) beobachtet. Oxidierte Verbindungen, wie Cysteinsulfinsäure (S) wirken in gleicher Weise.
Eine spezifische Hemmung dagegen wird für Mercaptide, wie L- und D-Cystein (E), Mercaptopyruvat (K),sowie Thioäther, wie L-Methionin (E), D-Methionin (K), S-Methyl-Methionin (K) und Phosphoserin (E) gemessen. Synechococcus zeigt bei D/L-Homocystein und L-Methionin das gleiche Verhalten.
Von besonderem Interesse ist das Verhalten der Enzyme bei Cystein. Auch hier wird für Chlorella ein sehr heterogenes Regulationsmuster beobachtet. Unter Kurzzeitbedingungen steigert L-Cystein die Enzyme, während nach 4 Tagen eine Hemmung und nach 5 Tagen Normalwerte gemessen werden. Beim Vergleich der Literatur ist zu bedenken, daß die Ergebnisse mit unterschiedlichen Konzentrationen und Wachstumszeiten ermittelt wurden. Bei Rhodopseudomonas globiformis sind beide Enzyme nach 10 Stunden erhöht (IMHOFF et al. 1981). Bei Anacystis cylindrica (SAWHNEY und NICHOLAS 1976) und Euglena gracilis (BRUNOLD und Schiff 1976) wird die ATP-Sulfurylase nicht beeinflußt. Für die anderen Enzyme liegen keine Untersuchungen vor. Lemna minor zeigt auch mit Sulfatzusatz nach 6 Tagen eine erhöhte ATP-Sulfurylase (BRUNOLD und SCHMIDT 1978), während die APS-Sulfotransferase auch mit Sulfatzusatz von L-Cystein (0,5 mM) in vivo und in vitro schon nach einem Tag gehemmt wird (BRUNOLD und SCHMIDT 1976). Für Lemna gibba konnte in vitro eine Steigerung der ATP-Sulfurylase beobachtet werden (ELLIS 1969). Tabak zeigt nach 6 Stunden noch normale ATP-Sulfurylaseaktivität bei aber schon erniedrigter APS-Sulfotransferase (BRUNOLD et al. 1981). Nach 2 Tagen ist auch die ATP-Sulfurylase gehemmt (JENNI et al.

1982; TRINITY et al. 1980), was für L-Cystein (0,1 mM) in vivo, aber nicht in vitro über längere Zeit beobachtet wurde (REUVENY und FILNER 1977). Ein Wachstum für 6 Tage auf L-Cystein steigert bei Erbse und Tomate die ATP-Sulfurylase (ELLIS 1969). Die Ergebnisse von Catharanthus-Zellkulturen, die eine Erhöhung von ATP-Sulfurylase und APS-Sulfotransferase auf L-Cystein (0,5 mM) zeigen, sind wegen der langen Inkubationszeit wenig aussagekräftig (SCHWENN et al. 1979) und stehen z.T. auch im Gegensatz zu den Daten der APS-Sulfotransferase. Auch bei der Bohne wird nach 2 Tagen eine Hemmung mit L-Cystein (0,1 mM) beobachtet (WYSS und BRUNOLD 1980). Bei der Hemmung durch L-Cystein muß es sich um eine feedback-Hemmung handeln, um so eine Überproduktion von Cystein zu vermeiden. Ein Abbau der Enzyme beim Wachstum auf gut metabolisierbaren S-Quellen kann aber nicht ausgeschlossen werden (REUVENY und FILNER 1982).

L-Cystin steigert bei Chlorella nur bis zum 4.Tag die Sulfataktivierung, was auch für die ATP-Sulfurylase von Tomate, Lemna gibba, Salat und Kohlrübe beobachtet wurde (ELLIS 1969). Unter Standardbedingungen tritt keine Beeinflussung bei Chlorella und Synechococcus auf. D-Cystin dagegen steigert nur 24 Stunden lang die Sulfataktivierung, um dann bei Chlorella die Enzyme zu hemmen.

Neben der Regulation durch L-Cystein muß auch Schwefelwasserstoff als regulierende Größe angesehen werden, da es während der Sulfataktivierung zum Cystein hin gebunden und beim Cysteinabbau wieder frei werden kann. Während die ATP-Sulfurylase bei Lemna von Schwefelwasserstoff nicht gehemmt wird (BRUNOLD und SCHMIDT 1976; BRUNOLD et al. 1981), kann die APS-Sulfotransferase gut reprimiert werden, wozu schon 6,5 ppm oder 0,5 mM Schwefelwasserstoff ausreichen (BRUNOLD und SCHMIDT 1976, 1978; VAN ARB und BRUNOLD 1980), wie dies auch für Bohnen zutrifft (WYSS und BRUNOLD 1980), wobei die Regulation über eine Neusynthese der APS-Sulfotransferase erfolgt (VAN ARB und BRUNOLD 1980). Nur bei Rhodopseudomonas sulfidophila wird durch Sulfid die ATP-Sulfurylase kompetitiv gehemmt (K_i 0,6 mM; COOPER 1980).
Auch L- und D-Methionin liefern sehr heterogene Ergebnisse. So hemmen beide Verbindungen die Sulfataktivierung bei Chlorella und Synechococcus unter Kurzzeitbedingungen, während sie nach 5 Tagen eine Erhöhung bewirken.Für L-Methionin liegen keine Daten für die APS-Sulfotransferase vor, während die ATP-Sulfurylase in vivo, aber nicht in vitro, bei Tabak (0,1 mM;REUVENY und FILNER 1977) und Erbse (10 mM; ELLIS 1969) gehemmt ist. Tomaten (10 mM), Lemna gibba (0,1 mM; ELLIS 1969) und Catharanthus-Zellkulturen (0,5 mM; SCHWENN et al. 1983) zeigen eine erhöhte ATP-Sulfurylase.
Eine vollständige Hemmung der ATP-Sulfurylase wurde bisher nicht beobachtet,

da somit eventuell die Biosynthese von Sulfolipiden und Sulfatestern unterbunden wäre, was zum Zelltod führen würde (REUVENY und FILNER 1977). Die Repression der APS-Sulfotransferase geschieht durch den Proteinabbau und kann vollständig sein, da nur L-Cystein durch diese Enzymkette gebildet wird (REUVENY und FILNER 1977).

3.4.5.5 Regulation der Cysteinsynthase

Ein Schwerpunkt der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und Regulation der Cysteinsynthase, die in der Literatur oft auch als O-Acetyl-L-Serin-Sulfhydrolase bzw. -Sulfhydrylase oder O-Acetyl-L-Serin-Acetat-lyase (Schwefelwasserstoff hinzufügend) (E.C. 4.2.99.8) bezeichnet wird. Sie soll ausführlicher besprochen werden.
Schwefelmangel zeigt bei Chlorella nach 4 bzw. 7 Tagen ein Maximum des Enzyms, bezogen auf Chlorophyll oder Protein (Abb. 27) und liegt deutlich höher als bei der Standardkultur. Auch andere Grün- und Blaualgen zeigen oft bei S-Mangel erhöhte Cysteinsynthase (Tab. 21, 22). Synechococcus verhält sich in gleicher Weise (Tab. 19). Auch höhere Pflanzen reagieren in gleicher Weise. Bakterien, wie Salmonella (KREDICH 1971) und höhere Pflanzen wie Tabak-Zellkulturen zeigen nach 2 Tagen (SMITH 1980; TRINITY et al. 1980), Mais nach 3 Tagen (PASSERA und GHISI 1982) und Bohne (SMITH und THOMPSON 1971; SMITH 1972) eine deutliche Steigerung. Ein S-Mangelverhalten kann für Chlorella nur noch für Formamidinsulfinsäure beobachtet werden. Bei Lemna liegt dies auch bei L- und D-Cystein sowie L-Methionin und L-Cystein/L-Methionin vor (Tab. 23,24).
Eine Induktion der Cysteinsynthase wird bei Chlorella für elementaren Schwefel und Thiosulfat beobachtet. Auch Mercaptide, wie Äthanthiol und -dithiol, Mercaptopropionsäure, Mercaptoäthansulfonsäure, Thioglykolsäure, Cysteamin, GSH, D/L-Homocystein, Thiosalicylsäure und DTE, S-Methyl-L-Cystein , Sulfanilsäure, Biotin und L-Methioninsulfoximin zeigen stets unter Standardbedingungen eine Stimulierung des Enzyms bei z.T. niedrigem oder z.T. normalen Wachstum. L-Serin steigert nur unter Kurzzeitbedingungen das Enzym. Bei Synechococcus gehören L- und D-Methionin sowie L-Methioninsulfon zu dieser Gruppe.
Eine Hemmung konnte unter Standardbedingungen für beide Organismen nicht beobachtet werden. Nur bei Lemna wird durch höhere Cysteinmengen (≥ 6 mM) die Cysteinsynthase gehemmt. Bei Chlorella hemmen Phosphoserin (E), D-Cystein (E), Mercaptopyruvat (K), Mercaptopyruvat/O-Acetylserin (K) bzw. /L-Cystein(K), L-Cysteinäthylester/O-Acetylserin (K) bzw. /Phosphoserin (K), D/L-Homocystein

sowie die Dithiole L-Cystin/Phosphoserin (K), D-Cystin/L-Methionin (K) und die Thioäther L-Methionin (K), S-Methyl-L-Methionin (K) und Triazol (K) die Cysteinsynthase.

Im Gegensatz zu Bakterien scheint die Cysteinsynthase bei höheren Pflanzen in vivo von einigen wichtigen S-Quellen reguliert zu werden.

L-Cystein zeigt wider Erwarten keine Endprodukthemmung in vivo bei Chlorella (Tab. 18), Lemna minor (BRUNOLD und SCHMIDT 1978), Tabak (BRUNOLD et al. 1981) und Bohne (WYSS und BRUNOLD 1980), wenngleich bei der Bohne auch eine Hemmung gefunden wurde (SMITH und THOMPSON 1971). Nur D-Cystein scheint bei Chlorella und L-Cystein in hohen Konzentrationen bei Lemna eine Hemmung bewirken zu können. In vitro konnte eine Hemmung der Cysteinsynthase bei Weizen (ASCANO und NICHOLAS 1977) und Trifolium (NG und ANDERSON 1978a) beobachtet werden, so daß SMITH (1975b) eine Regulation des Enzyms über den intrazellulären L-Cysteinspiegel annimmt. Nur bei phototrophen Bakterien tritt eine Repression durch L-Cystein ein (HENSEL und TRÜPER 1976, 1983; HENSEL 1979; IMHOFF et al. 1981).

Bei Bakterien hemmt L-Cystein die Cysteinsynthase von Salmonella (0,5 mM; KREDICH und TOMKIN 1966), Escherichia coli und Bacillus subtilis (CHAMBERS und TRUDINGER 1971), nicht aber bei Paracoccus (BURNELL und WHATLEY 1977) und steigert sie bei Pseudomonas (CHAMBERS und TRUDINGER 1971).

Der Einfluß von Schwefelwasserstoff, einem Reaktionsprodukt der Cysteinsynthase, kann bei Bakterien nicht ausgeschlossen werden, da es bei Escherichia coli die Cysteinsynthase senkt (JONES-MORETIMER et al. 1968), während Paracoccus nicht beeinflußt wird (BURNELL und WHATLEY 1977). Auch bei phototrophen Bakterien soll das Enzym in vivo gesenkt sein (HENSEL und TRÜPER 1976,1983; HENSEL 1979; IMHOFF et al. 1983). Bei Chlorella (Tab. 18), Lemna (BRUNOLD und SCHMIDT 1976) und Tabak (BRUNOLD et al. 1981) kann in vivo keine, bei der Bohne aber in vitro (1 mM; WYSS und BRUNOLD 1980) eine Hemmung beobachtet werden (BERTAGNOLLI und WEDDING 1977). Es wird angenommen, daß Schwefelwasserstoff über die Synthese von Cystein dessen Gehalt anhebt, der durch den Abbau bis zum Sulfat (4.3), die Cysteinsynthase über das Sulfat reguliert (BRUNOLD und ERISMANN 1974).

Als weiteres Substrat fungiert O-Acetyl-L-Serin, das aber bei Chlorella auch unter Kurzzeitbedingungen keinen Einfluß hat. Dies ist umso überraschender, da bei Bakterien O-Acetyl-L-Serin als Induktor der Cysteinsynthase gilt (SMITH 1980). Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß die Hemmung durch Triazol (K) dieser Behauptung widerspricht, da Triazol mit O-Acetyl-L-Serin Triazol-

-l-alanin bildet (KREDICH et al. 1975), was die Induktion der Cysteinsynthase bei Salmonella verhindert. Auch wenn dieses Ergebnis bei Chlorella eine Induktion der Cysteinsynthase durch O-Acetyl-L-Serin andeutet, können erst intensive Untersuchungen diese Aussage unterstützen. Die Cysteinbiosynthese bei Bakterien, wie Escherichia coli (JAGURA-BURDZY und KREDICH 1983) und Salmonella wird vom Cys-B-Genprodukt des Cys-Regulons reguliert. Zudem ist O-Acetyl-L-Serin als Effektor wichtig, während L-Cystein bzw. Schwefelwasserstoff als Repressor beschrieben wurden. Die Steigerung durch O-Acetyl-L-Serin wird häufig beobachtet, wie dies für Escherichia coli (JONES-MORETIMER et al. 1968) und Salmonella (HULANICKA et al. 1979; BAPTIST und KREDICH 1977) bekannt ist. Nur Paracoccus zeigt dieses Verhalten nicht (BURNELL und WHATLEY 1977). Bei Tabak steigert O-Acetyl-L-Serin unter N-Mangel das Enzym, da es als N-Quelle verwertet werden kann (SMITH 1980). Die pflanzlichen Cysteinsynthasen scheinen sich in diesem Punkt deutlich von denen der Bakterien zu unterscheiden, wie allgemein eine Regulation auf Genebene durch S-Quellen ausgeschlossen wird, da die Cysteinsynthase von Lemna proteasestabil ist (SCHMUTZ et al. 1983).

Die Wirkung der oben genannten Mercaptide war bisher nicht bekannt. Die Art der Induktion muß offen bleiben. Nur für GSH kann bei phototrophen Bakterien in vitro, aber nicht in vivo, eine Steigerung gefunden werden (HENSEL 1979), während Bakterien nur bei Bacillus megaterium in vivo (CHAMBERS und TRUDINGER 1971) und bei Salmonella (BAPTIST und KREDICH 1977) gleiches Verhalten zeigen. Bacillus subtilis und Escherichia coli (PASTERNAK et al. 1965) sowie Paracoccus in vitro (BURNELL und WHATLEY 1977) hemmen das Enzym. Im Gegensatz zu Chlorella bleibt L-Homocystein bei phototrophen Bakterien ohne Wirkung (HENSEL 1979). Mercaptopyruvat, ein mögliches Abbauprodukt des Cysteins, hemmt auch in Verbindung mit L-Cystein oder O-Acetyl-L-Serin bei Chlorella die Cysteinsynthase, was ökonomisch erscheint. Disulfide, wie L-Cystin, wirken in Kombination mit Phosphoserin und D-Cystin mit L-Methionin in gleicher Weise, wie dies auch von Bakterien, wie Salmonella (KREDICH 1971; BAPTIST und KREDICH 1977) bekannt ist. Das Enzym wird bei Escherichia coli entweder garnicht (PASTERNAK et al. 1965) oder negativ (JONES-MORETIMER et al. 1968) beeinflußt.

Der Thioäther Djenkolsäure bewirkt bei Salmonella eine Enzymsteigerung (KREDICH 1971; BAPTIST und KREDICH 1977), während es bei Pseudomonas (CHAMBERS und TRUDINGER 1971) ohne Einfluß ist. Cystathionin hemmt in vitro die Cysteinsynthase von Trifolium (NG und ANDERSON 1978a) und Paracoccus

(BURNELL und WHATLEY 1977).
Eine Hemmung durch L-Methionin wurde in vivo bisher weder für Lemna (THOMPSON et al. 1982), phototrophe Bakterien (HENSEL 1979) noch für Bakterien (BURNELL und WHATLEY 1977, CHAMBERS und TRUDINGER 1971), mit Ausnahme von Paracoccus (MORINAGA et al. 1983), aber auch für Synechococcus, auch für D-Methionin beobachtet (Tab. 19). Chlorella scheint unter Kurzzeitbedingungen durch Thioäther, wie L-Methionin und S-Methyl-L-Methionin gehemmt zu werden. In vitro Versuche mit dem gereinigten Enzym zeigen bei Weizen (1 mM; K_i 1,75 x 10^{-5}M; ASCANO und NICHOLAS 1977) und Trifolium (NG und ANDERSON 1978a) eine Hemmung.
Oxidierte S-Quellen, die bei Chlorella eine Stimulierung bewirken, wurden bisher bei Pflanzen nicht beobachtet. Auch bei phototrophen Bakterien ist S-Sulfocystein ohne Wirkung (HENSEL 1979). Nur bei Bakterien hemmt L-Cysteinsäure in vitro für Paracoccus das Enzym (BURNELL und WHATLEY 1977), während bei Pseudomonas eine Stimulierung auftritt (CHAMBERS und TRUDINGER 1971).
Sulfit zeigt bei Bakterien eine unterschiedliche Wirkung. In vivo kann es bei Escherichia coli sowohl eine Hemmung (JONES-MORETIMER et al. 1968) oder eine Steigerung (PASTERNAK et al. 1965) bewirken. Paracoccus wird in vitro, aber nicht in vivo, durch Sulfit (10 mM) gehemmt (BURNELL und WHATLEY 1977).

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß bei Grünalgen und höheren Pflanzen das Enzym nur durch feedback-Hemmung mit L-Cystein und eventuell Schwefelwasserstoff reguliert wird. O-Acetyl-L-Serin hat im Gegensatz zu Bakterien keinen Einfluß als Induktor auf der Genebene.

3.4.5.6 Regulation der S-Sulfocysteinsynthase

Diese Enzym ist bisher nur von Bakterien (CHAMBERS und TRUDINGER 1971) und phototrophen Bakterien (HENSEL und TRÜPER 1976) bekannt und scheint bei Chlorella unter Normalbedingungen nicht vorhanden zu sein (3.7.4.1). Da es sich bei dieser Enzymaktivität um die Kombination von Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase zu handeln scheint (3.7.4.1), werden die Ergebnisse mit der Thiosulfatreduktase besprochen. Ein Vergleich mit den Ergebnissen von Bakterien und phototrophen Bakterien ist nicht möglich.
Aus den Ergebnissen von Tab. 25 könnte aber eine Induktion einer S-Sulfocysteinsynthase auch bei Chlorella geschlossen werden, da das Verhältnis von Thiosulfatreduktase und "S-Sulfocysteinsynthase" von 10/1 bei Sulfat zu 6/5 bei Sulfat/S-Methyl-L-Methionin schwankt, wie dieser Trend bei einigen Verbindungen auch in Tab. 18 und 19 beobachtet wird.
Wäre die Thiosulfatreduktase oder Cysteinsynthase nur das limitierende Enzym

der zusammengesetzten Aktivität der "S-Sulfocysteinsynthase", so müßte die Regulation der einzelnen Enzyme mit der Regulation der "S-Sulfocysteinsynthase" übereinstimmen. Daher soll in späteren Untersuchungen der induzierbaren S-Sulfocysteinsynthase nachgegangen werden.

3.4.5.7 Regulation der Cysteindesulfhydrasen

Da diese Enzymaktivitäten nicht eigentliches Ziel der Arbeit waren, werden nur die wichtigsten Verbindungen angesprochen.
Bei allen untersuchten pflanzlichen Organismen gibt es zwei stereospezifische Cysteindesulfhydrasen, die bei Blau- und Rotalgen geringere Aktivitäten als bei Grünalgen zeigen (Tab. 12, 22). Das Verhältnis der beiden Enzyme ist starken Schwankungen unterworfen. Für Synechococcus liegen keine Werte unter Standardbedingungen vor.

a) L-Cysteindesulfhydrase

Die Existenz eines eigenen Enzyms ist bei Pflanzen, besonders Chlorella, anzuzweifeln, da es sich bisher nicht von der Cysteinsynthase trennen ließ (3.7.1). Bei der L-Cysteindesulfhydrase scheint es sich um eine Seitenaktivität der Cysteinsynthase bei Chlorella zu handeln, wie dies unter 3.7.3 diskutiert wird.
Bei Chlorella erhöht S-Mangel bei geringem Wachstum das Enzym ebenso wie bei Tabak (HARRINGTON und SMITH 1980). Während das Enzym der Sulfatkultur fast stetig abnimmt, weist die S-Mangelkultur, bezogen auf Protein, nach 7 Tagen ein ein relatives Maximum auf. Bezogen auf Chlorophyll steigt dagegen das Enzym der S-Mangelkultur an (Abb. 27). Eine spezifische Steigerung des Enzyms wird bei Chlorella für L-Cystein (E,K), D-Cystein (K), D-Cystin (E) beobachtet. Auch bei Lemna steigert L- und D-Cystein das Enzym. Eine Hemmung tritt bei Chlorella mit D-Cystein (E), D-Cystin (K) und Mercaptopyruvat (K) auf. Das Enzym wird bei Lemna durch L-Methionin gehemmt.
Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Literatur, so müssen auch die von Bakterien herangezogen werden, da nur wenige Daten für Pflanzen vorliegen. L-Cystein, Ausgangsprodukt des Enzyms steigert nach Art einer Substratinduktion das Enzym bei Chlorella (Tab. 18), Gurke, Kürbis, auch in vitro (10 mM) (SEKIYA et al. 1982b; RENNENBERG 1983b) und Tabak (0,5 mM; HARRINGTON und SMITH 1980). Bei Salmonella wurde die Induktion über die de-novo-Synthese nachgewiesen (COLLINS und MONTY 1973; COLLINS et al. 1973; KREDICH et al. 1973). Auch Escherichia coli, Sarcina und Aerobacter zeigen eine Steigerung (KUMAGAI et al. 1975a).

Für D-Cystein wird bei Chlorella unter Kurzzeitbedingungen (Tab. 20) und bei Lemna (Tab. 23,24), wie bei Kürbis in vivo (SEKIYA et al. 1982b) und in vitro (RENNENBERG 1983b) eine Steigerung im Gegensatz zu Salmonella (COLLINS und MONTY 1973) beobachtet, wobei hier eine leichte Hemmung auftritt, wie sie auch bei Chlorella unter exponentiellem Wachstum beobachtet wird (Tab. 20).

Eine Endprodukthemmung liegt bei Schwefelwasserstoff vor, der bei Rhodopseudomonas sulfoviridis (NEUTZLING und TRÜPER 1982) und bei Salmonella das Enzym nicht kompetitiv (COLLINS und MONTY 1973) oder kompetitiv (KREDICH et al. 1973) und auch in vitro (GUARNEROS und ORTEGA 1970) hemmt. Nur bei Tabak scheint Schwefelwasserstoff keinen Einfluß auf das Enzym zu haben (HARRINGTON und SMITH 1980).
Unter Kurzzeitbedingungen hemmt D-Cystin bei Chlorella (Tab. 20) und Salmonella in vitro (0,5 mM; KREDICH et al. 1973) das Enzym,während für L-Cystin bei Escherichia coli, Sarcina und Aerobacter eine Steigerung beobachtet werden kann (KUMAGAI et al. 1975a).
Interessant ist noch, daß Mercaptopyruvat allein oder in Kombination nach kurzer Zeit zur Hemmung des Enzyms führt (Tab. 20).
Von den Thioäthern wird S-Methyl-L-Cystein als Induktor bei Chlorella (Tab. 20) und Kürbis (SEKIYA et al. 1982b), Salmonella (COLLINS und MONTY 1973) und in vitro bei Kürbis (RENNENBERG 1983b) beschrieben. L-Methionin erzeugt bei Chlorella unter exponentiellen Bedingungen erhöhte Aktivität, wie sie auch in vitro für Kürbis (RENNENBERG 1983b) und Salmonella (COLLINS und MONTY 1973) gefunden wurde, wo es die Aggregation des Enzyms verhindern soll. Nur bei Kürbis (SEKIYA et al. 1982b) wird normales und bei Lemna (Tab. 23,24) gehemmte Enzymaktivität ermittelt, wie dies auch bei Chlorella für S-Methyl-L-Methionin (K) zutrifft. Besonderer Erwähnung bedürfen O-Acetyl-L-Serin (E), das eine Enzymstimulierung, und Phospho-L-Serin (E), welches eine Hemmung bei Chlorella bewirkt.
Cyst(e)inester scheinen das Enzym bei Chlorella vollständig zu hemmen.
Es muß besonders hervorgehoben werden, daß das Enzym durch eine Vielzahl von Verbindungen in ähnlicher Weise wie die Cysteinsynthase reguliert werden kann.

b) D-Cysteindesulfhydrase

Da die D-Cysteindesulfhydrase erst seit kurzem bekannt ist, liegen nur wenige Ergebnisse über ihre Regulation vor.
Bei Chlorella soll die D-Cysteindesulfhydrase ein konstitutives Enzym sein (SCHMIDT und ERDLE 1983), da weder L- und D-Cystein noch L-Methionin und Thiosulfat eine Regulation bewirken.

Unter Kurzzeitbedingungen stimulieren bei Chlorella trotzdem L- und D-Cystein auch in Kombination mit O-Acetyl-L-Serin und Phospho-L-Serin das Enzym, wohingegen D-Cystein das Enzym unter exponentiellen Bedingungen hemmt. L- und D-Cystin sowie Mercaptopyruvat scheinen in gleicher Weise zu wirken.

3.4.5.8 Regulation der Thiosulfatreduktase

Auch dieses Enzym wurde erst vor kurzem auch bei Pflanzen nachgewiesen, so daß Daten über seine Regulation vorwiegend von Bakterien und Hefen vorliegen. Es ist Teil der "S-Sulfocysteinsynthase"-Aktivität (3.7.4.1).
Schwefelmangel führt bei Chlorella zu erhöhter Enzymaktivität, die am 6.Tag ihr Maximum erreicht (Abb. 27; GAMON 1983). Unter Standardbedingungen zeigen auch Mercaptoessigsäure, N-Acetyl-L-Serin, Methioninol und S-Carboxymethyl-L-Cystein ein gleiches Verhalten. Bei Synechococcus bleibt S-Mangel ohne Wirkung. Ein gleiches Verhalten wurde auch für Plectonema (GAMON 1983) beobachtet.
Eine spezifische Stimulierung tritt bei L-Cystein (E,K), L-Cystein/OAS (K) bzw. /PSer (E), D-Cys (S,K), D-Cys/OAS (K) bzw. /PSer (K), Cysteamin (S), L-CME (S,K), L-CME/OAS (K), L-CÄE (S,E,K), L-CÄE/OAS (K) bzw. PSer (E) bzw. /L-Methionin (K) bzw. /NAS (K) und L-Cystindiäthylester (S), D/L-HCys (K), reduziertes Glutathion (S), S-Methyl-L-Cystein (S) und S-Methyl-L-Cystein (S) auf. Auch L-Cystin (E), L-Cystin/OAS (K), D-Cystin/OAS (K), D-Homocystin (S), Cystathionin (S), Lanthionin (K), OAS (E), Formamidinsulfinsäure (S), Methansulfonsäure (S), Dimethylsulfoxid (S), Aminoäthylhydrogensulfat (S) und Biotin (S) zeigen gleiches Verhalten. Bei Lemna steigern L-Cys (12 Stunden, 0,6 mM), L-Cys/L-Methionin (24 Stunden) und D-Cys (12 und 24 Stunden) sowie Thiosulfat (24 Stunden) das Enzym.
Eine spezifische Hemmung beobachtet man beim Wachstum auf D-Cystein (E), L-CÄE/PSer (K), Mercaptopyruvat (K), Mercaptopyruvat/OAS (K) bzw./L-Cys (K) bzw. /L-CÄE, L-Cystin (K), L-Cystin/PSer (K), D-Cystin/L-Methionin (K), S-Methyl-L-Methionin (K), L-Methioninsulfoximin (K), NAS (K), Triazol (K) und PSer (E). Bei Synechococcus hemmt α-Keto-γ-Methiolbutyrat das Enzym. Bei Lemna tritt dies bei L-Methionin (12 Stunden), L-Cys (24 Stunden, 0,6 mM) und L-Cys/L-Methionin (12 Stunden) auf.
Die Thiosulfatreduktase wird bei Chlorella (GAMON 1983), Lemna (Tab. 23, 24) wie auch bei marinen Bakterien (WHITED und TUTTLE 1983) durch Thiosulfat stark erhöht, wobei es als Induktor des Enzyms fungieren soll. Schwefelwasserstoff,

ein Reaktionsprodukt, hemmt in vitro bei Hefe (UTHEG und WESTLEY 1979) das Enzym kompetitiv, wobei es sich um eine feedback-Hemmung handeln dürfte. Sulfit, ein weiteres Reaktionsprodukt, hemmt in vitro die Thiosulfatreduktase bei Chromatium (HASHWA und PFENNIG 1972), Hefe (UTHEG und WESTLEY 1979) und Thiocapsa (5 mM; PETUSHKOVA und IVANOVSKII 1976). Es dürfte sich auch hier um eine Endprodukthemmung handeln.
Sulfat ist in vitro ein kompetitiver Hemmstoff bei Hefe (UTHEG und WESTLEY 1979).
Obwohl L- und D-Cystein das Enzym bei Chlorella und Lemna (GAMON 1983) unter Kurzzeitbedingungen erhöhen, können sie besonders bei Lemna auch zur Hemmung führen.
Von den anderen bei Chlorella und Lemna beobachteten regulierenden Verbindungen ist bisher nur das oxidierte Glutathion beschrieben, das im Gegensatz zu reduziertem Glutathion bei Chlorella keine Steigerung, sondern eine Hemmung bei Hefe in vitro (UTHEG und WESTLEY 1979) bewirkt. L-Methionin steigert bei Chlorella (S,K) das Enzym (GAMON 1983), was im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen steht. Bei Lemna hemmt es das Enzym (Tab. 23, 24; GAMON 1983).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Thiosulfatreduktase durch Thiosulfat induziert und durch die Endprodukte Sulfit und Schwefelwasserstoff gehemmt wird.

3.4.5.9 Regulation der Glutaminsynthetase

Die Glutaminsynthetase spielt im Schwefelstoffwechsel keine Rolle. Trotzallem war ihre Regulation durch S-Quellen von Interesse, da sie z.B. durch Thioredoxin stimuliert werden kann (SCHMIDT 1981). Auf den gegenseitigen Einfluß von N- und S-Stoffwechsel wird unter 4.1 näher eingegangen.
Das Verhalten des Enzyms unter S-Mangel steht im Gegensatz zu dem der meisten anderen Enzyme. Bei Chlorella und Synechococcus wird das Enzym durch S-Mangel bei schlechtem Wachstum stark gehemmt, was auch für Tabak und Synechococcus (RHODES und TRINITY 1979) beobachtet wird. Durch S-Mangel wird die Stickstoffixierung unterbunden, was zu einer Stickstoffreaktivierung der Zelle selbst führt.
Von den eingesetzten Schwefelquellen werden nur die relevanten besprochen, während der Einfluß der anderen bereits aus den Kapiteln 3.4.2.8 und 3.4.3.8 ersichtlich ist. Eine spezifische Hemmung wird für Chlorella und Synechococcus besonders für L-Methioninsulfoximin, aber auch für L- und D-Cystein, L- und D-Cystin und L-Methionin beobachtet.

Tab. 25 : Regulation der Glutaminsynthetase bei Chlorella

Schwefelverbindung im Medium	Konzentration (M)	Chl.	SA	CS	SCS	TSR	GS	g.S.
Sulfat	2×10^{-4}	3,81	834	124	0,58	5,5	320	63
L-Methioninsulfoximin	3×10^{-4}	0,05	1201	238	4,92	19,1	92	308
S-Methyl-L-Methionin	3×10^{-4}	0,91	3681	647	6,72	16,5	1088	167
Sulfat/L-Methioninsulfoximin	3×10^{-4}	0,20	2933	184	0,44	f	108	f
" "	3×10^{-5}	7,60	505	112	3,88	0,6	529	39
Sulfat/S-Methyl-L-Methionin	3×10^{-4}	5,50	609	105	4,94	6,0	436	44
" "	3×10^{-5}	5,10	667	109	3,80	7,1	598	61
Sulfat/L-Methioninsulfoximin/S-Methyl-L-Methionin	3×10^{-5}/ 3×10^{-5}	5,18	810	92	4,02	7,2	268	42

Die Chlorella-Kulturen wuchsen unter Standardbedingungen (3.4.2) auf einem Schwefelmangelmedium (2.1.1.1), dem die genannten Verbindungen in der angegebenen Konzentration zugesetzt worden waren. Die Enzymaktivitäten wurden, wie unter 3.4.2 beschrieben, ermittelt. Die Einheiten sind :
Chl. = Chlorophyll (mg x 750 ml Medium); SA = Sulfataktivierung (nmol säurelabiles (^{35}S)-Sulfit x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); CS = Cysteinsynthase (µmol Cystein x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); SCS = S-Sulfocysteinsynthase (µmol "Cystein" x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); TSR = Thiosulfatreduktase (µmol Sulfid x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1}); GS = Glutaminsynthetase (µmol umgesetztes Glutamin x mg Chl.$^{-1}$ x h^{-1});
g.S. = Gebundenes Sulfid (nmol Sulfid x mg Chl.$^{-1}$). f = Daten fehlen.

Auf den Einfluß von Stickstoffverbindungen soll nur kurz eingegangen werden. Stickstoffmangel steigert im Gegensatz zum Schwefelmangel die Glutaminsynthetase, wobei über eine de-novo-Synthese eine Reaktivierung des Enzyms erfolgt (TISCHNER und HÜTTERMANN 1980), welche für Chlorella und Chlamydomonas beobachtet wird (CULLIMORE und SIMS 1981). Ammoniumionen hemmen dagegen in vitro das Enzym bei Anabaena (10 mM; ROWELL et al. 1979) und Chlorella (30 mM; EVSTIGNEEVA et al. 1974, engl. Ausg.).
Ein Einfluß von schwefelhaltigen Verbindungen wird von TRINITY et al. (1980) bei Tabak als unbedeutend angesehen, was im Widerspruch zum Einfluß von L-Methioninsulfoximin steht. Diese Verbindung hemmt die Glutaminsynthetase irreversibel, wie dies für Tabak (RENNENBERG und UTHEMANN 1980), Lemna (STEWARD und RHODES 1976), Chlamydomonas (CULLIMORE und SIMS 1981), Chlorella und Synechococcus (Tab. 18,19) gefunden wurde. Der Wirkungsmechanismus dieser Verbindung ist weitgehend aufgeklärt. Bei der Reaktion der Glutaminsynthetase wird das Substrat Glutamin zuerst gebunden und zum γ-Glutamylphosphat phosphoryliert, um dann mit Ammoniumionen Glutamin zu bilden. L-Methioninsulfoximin wird in gleicher Weise wegen seiner Strukturanalogie gebunden und auch am γ-ständigen Stickstoff phosphoryliert. Seine Bindung ist aber stabiler, so daß die Glutaminbildung gehemmt ist (RENNENBERG und UTHEMANN 1980; RONZIO

et al. 1969). Das gleiche Wirkungsprinzip tritt auch bei der Hemmung der Glutathionbiosynthese auf, da auch hier ein γ-Glutamylphosphat in der γ-Glutamylcysteinsynthase gebunden vorliegt. Es sei noch erwähnt, daß L-Methioninsulfoximin die Freisetzung von Ammoniumionen in der Photorespiration von Serin bei Anabaena stimuliert (BERGMAN 1984).

Da unter Standardbedingungen eine Steigerung des Enzyms durch S-Methyl-L-Methionin beobachtet wurde, sollte das Zusammenspiel von Glutaminsynthetase, L-Methioninsulfoximin und S-Methyl-L-Methionin näher untersucht werden (Tab. 25). Die Hemmung des Enzyms bestätigt sich auch hier für L-Methioninsulfoximin (3×10^{-4}M) mit und ohne Sulfatzusatz, wohingegen S-Methyl-L-Methionin allein wohl geringes Wachstum aber erhöhte Aktivität bewirkt. Niedrige L-Methioninsulfoximinkonzentrationen (3×10^{-5}M) bleiben dagegen ohne Wirkung. Eine Kombination von L-Methioninsulfoximin und S-Methyl-L-Methionin in Gegenwart von Sulfat hebt die Hemmung durch L-Methioninsulfoximin auf, da hier eine Konkurrenz der Strukturanaloga L-Methioninsulfoximin und S-Methyl-L-Methionin um die aktive Stelle des Enzyms besteht, so daß normale Werte auftreten.

Obwohl in vivo das Enzym durch L-Methioninsulfon bei Chlorella (TISCHNER und HÜTTERMANN 1980) und Synechococcus (SCHMIDT 1981) eine Steigerung erfährt, hemmt diese Verbindung und L-Methioninsulfoxid in geringerem Maße die Glutaminsynthetase bei Tieren (RONZIO et al. 1969) und Bakterien (WEISBROD und MEISTER 1973).

Die Wirkung der bisher nur bei Chlorella und Synechococcus beobachteten regulierenden Verbindungen ist unklar. Es muß aber bedacht werden, daß die Aminosäuren als S- und N-Quelle wirken können.

3.4.5.10 Einfluß auf den Gehalt an gebundenem Sulfid

Der Gehalt an gebundenem Sulfid setzt sich aus meheren Fraktionen zusammen (3.5.5), von denen eine elementarer Schwefel ist, und kann daher nicht mit den Literaturangaben verglichen werden.

Bei Chlorella zeigt auch hier Schwefelmangel einen erhöhten Sulfidgehalt bei geringem Wachstum, der auf das noch im Medium vorhandene Eisenchlorid zurückzuführen ist. Zudem gehören auch Cysteamin, Dimethylsulfoxid, der Sulfatester, Sulfanilsäure und S-Carboxymethyl-L-Cystein dazu. Bei Synechococcus zeigt Schwefelmangel keine Änderung gegenüber der Sulfatkultur.

Einen stark erhöhten Sulfidgehalt beobachtet man bei Chlorella besonders bei Cyst(e)inestern. Bei L-Cysteinmethyl- (S,K), L-Cysteinäthyl (S,E,K) und Cystindiäthylester (S) wird elementarer Schwefel stets als Bestandteil

des gebundenen Sulfids nach 3.5.2 extrahiert und dünnschichtchromatographisch nachgewiesen. Auch die Kombination von L-Cysteinäthylester mit OAS (E,K), PSer (E,K), L-Methionin (K), L-Serin (K) und NAS (K) führt zu gleichen Ergebnissen. L-Cystein/OAS (E) bzw. /PSer (E,K), D-Cystein/OAS (K) bzw. PSer (K) sowie D/L-Homocystein (K) und D-Homocystin (S) erhöhen den Sulfidgehalt. Die Thioäther L-Methionin (E,K), D-Methionin (E) und Cystathionin sowie elementarer Schwefel (S), Thiosalicylsäure (S), Biotin (S), Formamidinsulfinsäure (S), Methansulfonsäure (S) sowie PSer (E), OAS (K) und NAS (K) gehören auch zu dieser Gruppe. Bei Synechococcus zeigen nur elementarer Schwefel und L-Methioninsulfoximin erhöhte Werte.
Eine Senkung des Sulfidgehaltes tritt bei Chlorella für OAS (E), Mercaptopropionsäure (S), L-Cystin (E), L-Cystin/PSer (K), D-Cystin (K), D-Cystin/L-Methionin (K), D-Methionin (K) und α-Keto-γ-Methiolbutyrat auf. Mercaptopyruvat (S) und Mercaptopyruvat/L-Cysteinäthylester (K) senken den Sulfidgehalt erheblich, um sie allein oder mit OAS unter Kurzzeitbedingungen vollständig wie bei Triazol und L-Methioninsulfoximin zu hemmen.
Bei Lemna konnte unter allen S-Quellen, sogar mit Cyst(e)inestern, (3.4.4.3) keine Sulfidbildung beobachtet werden.
Der Reaktionsweg von Cysteinestern zu elementarem Schwefel wird unter 3.5.5 aufgezeigt.

3.4.5.11 Regulation der ß-Cyanoalaninsynthetase

Die Regulation dieses Enzyms wurde bisher nur bei Bakterien untersucht, wenngleich es schon bei einigen Pflanzen nachgewiesen wurde. Faßt man die unter 3.4.3.10 genannten Verbindungen zusammen, so scheinen Mercaptopyruvat und PSer das Enzym zu steigern, während L-Cystin und OAS eine Hemmung bewirken. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von dem cyanogenen Chromobacterium, dessen Enzym durch OAS stimuliert wird, während L-Cystein und L-Methionin einen negativen Einfluß haben (RODGERS 1982). Bei Bacillus megaterium ist Cyanid ohne Einfluß, während Djenkolsäure und Serin das Enzym hemmen (CASTRIC und CONN 1971).

3.5 Bildung von elementarem Schwefel

Die folgenden Untersuchungen wurden durch die Beobachtung angeregt, daß Chlorella beim Wachstum auf gewissen Schwefelquellen (Tab. 18) große Mengen von gebundenem Sulfid anhäuft. Zudem konnten auch hohe Nullwerte von Schwefelwasserstoff als Methylenblau beim Test auf Thiosulfatreduktase und

L-Cysteindesulfhydrase beobachtet werden, die für die TSR bei gutem Wachstum auf Liponsäureamid (1,78 µmol/mg Chlorophyll) oder mäßigem Wachstum auf Cysteinestern wie Cysteinmethylester (10 µmol/mg Chlorophyll) oder Cysteinäthylester (25 µmol/mg Chlorophyll) beobachtet werden (Tab.18). In allen Fällen wurde Schwefelwasserstoff nur in Gegenwart von Thiolen wie DTE freigesetzt, so daß es interessant erschien, die Struktur des gebundenen Sulfids zu ermitteln, wobei es sich auch um ein Zwischenprodukt der assimilatorischen Sulfatreduktion handeln könnte.

3.5.1 Bildung und Extraktion des gebundenen Sulfids

Da die Mengen an gebundenem Sulfid beim Wachstum auf Cysteinestern (Tab. 18) am höchsten waren, ließ man Chlorella-Kulturen im präparativen Maßstab auf einem S-Mangelmedium wachsen, dem Natriumsulfat und Cysteinäthylester zugesetzt waren (2.4.2) und extrahierte in der dort beschriebenen Weise. Das gebundene Sulfid wurde mit DTE über die Methylenblaumethode nach 2.2.8.1 und 2.2.5 bestimmt. Nahm man den am Rotationsverdampfer eingeengten Methanolextrakt nicht sofort in Petroläther, sondern zuerst in Wasser auf, so konnte ein Teil des gebundenen Sulfids gelöst werden, während der andere Teil nur im Petroläther löslich war (Tab. 26).
Somit enthält Chlorella drei verschiedene Fraktionen von"gebundenem Sulfid" und zwar folgende :

1. Einen in Methanol unlöslichen Rückstand, der bei 2.5.6 bestimmt wird
2. Eine hydrophile Fraktion, die im Papierchromatographiesystem : Äthanol/Pyridin/Wasser (50/20/15) nach 6 Stunden einen R_f-Wert von 0,98 ergab.
3. Eine hydrophobe Fraktion, die in vielen organischen Lösungsmitteln löslich war und weiter aufgereinigt wurde.

Als "gebundenes Sulfid" werden somit allgemein solche Substanzen bezeichnet, die in Gegenwart von Thiolen Schwefelwasserstoff freisetzen. Trotzdem ist in diesem folgenden Abschnitt mit dem gebundenen Sulfid nur die Petrolätherfraktion gemeint.

3.5.2 Aufreinigung

Die Petrolätherfraktion wurde mit drei hintereinandergeschalteten Dünnschichtchromatographiesystemen (Tab. 27 , 1 -3) weitgehend aufgereinigt (2.4.2).
Die Menge an gebundenem Sulfid wurde nach 2.2.8.1 und 2.2.5 bestimmt, indem man das Gel streifenweise (0,5 cm) abkratzte und mit heißem Methanol extrahierte.

Tab. 26 : Zusammensetzung des "gebundenen Sulfids" aus Chlorella

Fraktion	geb. Sulfid (total)	%
ganze Zellen	22,632 µmol	100
Wasserfraktion	9,080 µmol	40
Petrolätherfraktion	3,312 µmol	15
Methanolniederschlag	3,143 µmol	14
Verluste		31

Eine Chlorella-Kultur wurde in einer 10 l-Flasche 5 Tage auf einem S-Mangelmedium gezogen, dem 2×10^{-4} M Sulfat und 3×10^{-4} M L-Cysteinäthylester zugesetzt worden waren (2.1.1.1). Bei der optischen Dichte (680 nm) von 0,656 und der Zellzahl von $2,9 \times 10^{6}$ Zellen/ml wurde die Kultur abgeerntet, einmal mit thiolfreiem Aufbrechpuffer (2.1.1.2) gewaschen (9,6 g FG) und in 48 ml desselben Puffers aufgenommen. Sodann bestimmte man den Gehalt der ganzen Zellen an gebundenem Sulfid in der unten beschriebenen Weise. Nach erneutem Abzentrifugieren extrahierte man den Niederschlag mit 50 ml Methanol bei 80°C und 10 Minuten (2.4.1.1). Nach erneutem Zentrifugieren kann der in Methanol unlösliche Niederschlag gewonnen werden (2,6 g FG), von dem ein Aliquot (0,5 g FG) mit 2,5 ml Wasser zur Bestimmung von gebundenem Sulfid aufgeschlämmt wurde. Nach Einengen des Methanolüberstandes (11,6 mg Chlorophyll) am Rotationsverdampfer löste man das hydrophile Sulfid durch Zugabe von 10 ml Wasser. Der wasserunlösliche Rückstand wurde mit 20 ml Petroläther (Sp. 40 - 65°C) aufgelöst. Der Gehalt an gebundenem Sulfid kann in folgender Weise bestimmt werden :
100 µmol Tris-freie Base, 2 µmol DTE und die entsprechende Menge an sulfidhaltiger Fraktion (100 µl ganze Zellen, Wasserfraktion, 200 µl Petrolätherfraktion, Methanolrückstand) in einem Endvolumen von 1 ml werden 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Das gebildete H_2S bestimmte man als Methylenblau (2.2.5) bei 746 nm (3.1.3) gegen einen Nullwert ohne DTE der jeweiligen Fraktion.
Die Ergebnisse werden mit einem $\varepsilon_{746\ nm}$ von 16,61 $cm^2 \times mol^{-1}$ umgerechnet (Tab. 2).

Dabei zeigte sich, daß sich die Bande des gebundenen Sulfids stets mit einer Zone der UV-Löschung (2.3.1) deckte.
Seitdem wird das gebundene Sulfid bei der Aufreinigung mit diesem schnellen Nachweisverfahren bei 254 nm ermittelt. Mit dem Laufmittelsystem 1) Petroläther / Diäthyläther (99,5 / 0,5) können Chlorophylle (R_f = 0) und Carotinoide (R_f = 0,4 - 0,6) von gebundenem Sulfid (R_f = 0,84) quantitativ abgetrennt werden. Mit dem System 2) Wasser / Aceton (9 / 1) werden Lipide abgetrennt, die im System 1) cochromatographieren, wohingegen das gebundene Sulfid am Start liegen blieb. Nach dem Laufmittel 3) Äthylacetat ist das gebundene Sulfid soweit gereinigt, daß es zu chemischen Analysen verwendet werden kann.

Tab. 27 : R_f-Werte des gebundenen Sulfids

	Lösungsmittel	(v/v)	R_f
1	Petroläther (Sdp. 40 - 65°C)/Diäthyläther	99,5/0,5	0,84
2	Aceton/Wasser	1/9	0,00
3	Äthylacetat		0,86
4	Petroläther (Sdp. 40 - 65°C)/Diäthyläther/Eisessig	9/1/0,1	0,68
5	Petroläther (Sdp. 40 - 65°C)		0,57
6	Aceton/Wasser	1/1	0,00
7	Aceton/Wasser	9/1	1,00
8	n-Hexan		0,88
9	n-Heptan		0,84
10	cyclo-Hexan		0,81
11	Chloroform/Methanol	9/1	0,88
12	Chloroform/Methanol/Wasser	46/18/3	0,85
13	Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser	85/25/15/3	1,00
14	Chloroform/n-Hexan	2/3	0,96

Es wurden analytische Kieselgel-GF_{254}-Platten verwendet. Das gebundene Sulfid ermittelte man durch UV-Löschung oder die Bildung von Schwefelwasserstoff.

3.5.3 Nachweis und Eigenschaften von elementarem Schwefel

Das gebundene Sulfid kann, wie schon zuvor erwähnt, durch Thiole, wie DTE in der unter 2.2.8.1 beschriebenen Reaktion als Schwefelwasserstoff freigesetzt und über die Methylenblaubildung (2.2.5) bestimmt werden. Dieser Test sowie das Verhalten bei der Aufreinigung deuten schon auf die mögliche chemische Struktur des gebundenen Sulfids als elementarer Schwefel hin.
Deshalb wurde mit käuflicher Schwefelblüte die Schwefelwasserstoffreisetzung durch DTE näher untersucht (Abb. 28).
Ein weiterer klassischer Nachweis für elementaren Schwefel stellt die Bildung von Thiocyanat in Gegenwart von Cyanid dar, die auch nach 2.2.8.2 mit dem gebundenen Sulfid durchgeführt wurde. Das Thiocyanat bestimmte man nach 2.2.6 als Eisenrhodamin-Komplex. Vergleicht man die Menge an gebildetem Schwefelwasserstoff und Thiocyanat, die nach der Reaktion der gereinigten

Fraktion mit DTE bzw. Cyanid erhalten wird, so ergibt sich ein Verhältnis von 1 : 1,05 (Ergebnisse nicht näher dargestellt). Beide Verfahren sind somit gleich gut zum Nachweis von gebundenem Sulfid geeignet.

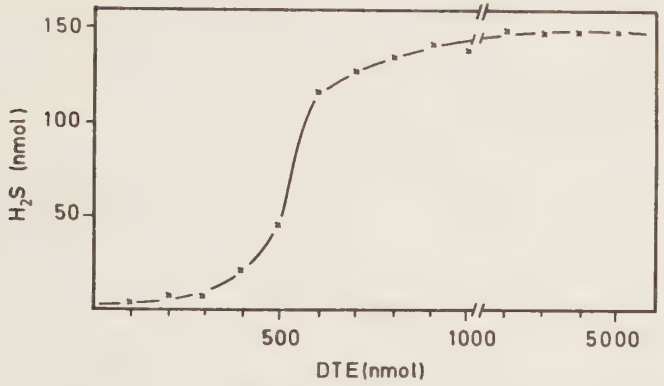


Abb. 28 : Reduktion von elementarem Schwefel mit Dithioerythritol

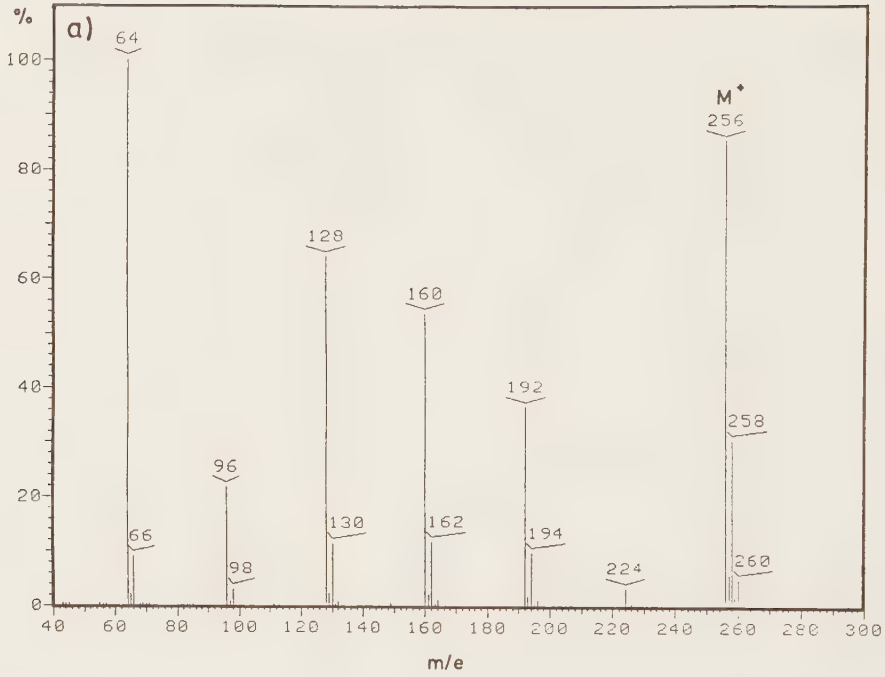
Der Versuchsansatz enthielt in 1 ml Endvolumen 100 µmol Tris-HCl pH 9,0 , DTE wie angegeben und 8 µmol S^o, gelöst in 100 µl Methanol. Inkubation erfolgte bei 37°C für 20 Minuten. Der gebildete Schwefelwasserstoff wurde wie in 2.2.8.1 als Methylenblau bestimmt.

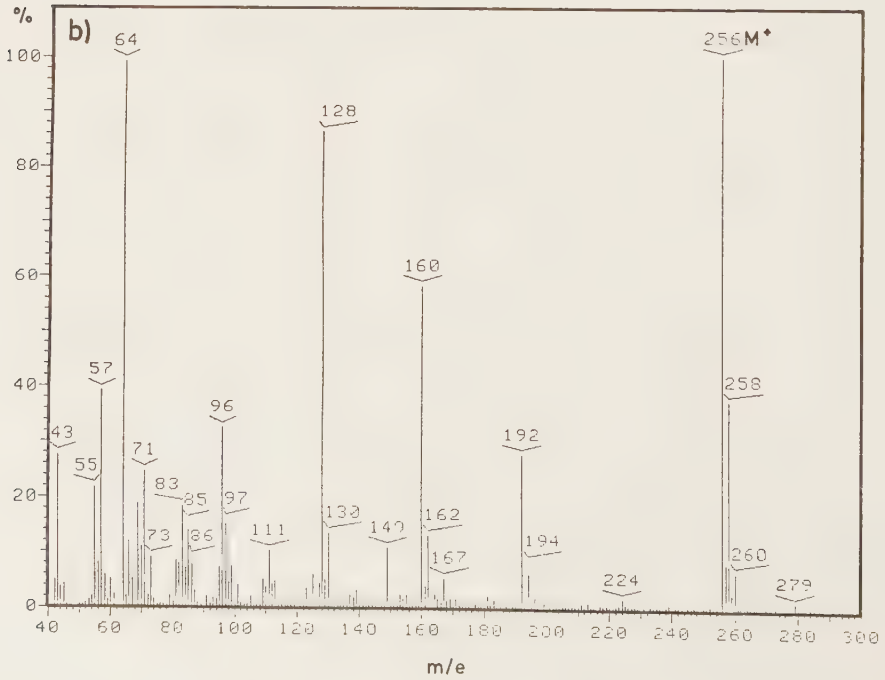
Erst durch die Massenspektrometrie konnte das gebundene Sulfid eindeutig als elementarer Schwefel identifiziert werden. Dabei ergab sich nach direktem Einbringen der Petrolätherfraktion (2.3.6) das Massenspektrum, dessen Fragmente in Abb. 29 dargestellt sind.
Nach Abzug bekannter Verunreinigungen ergibt sich ein Molekülion M^+ von 256 m/e, welches einem S_8-Ring, der stabilsten Form von elementarem Schwefel,

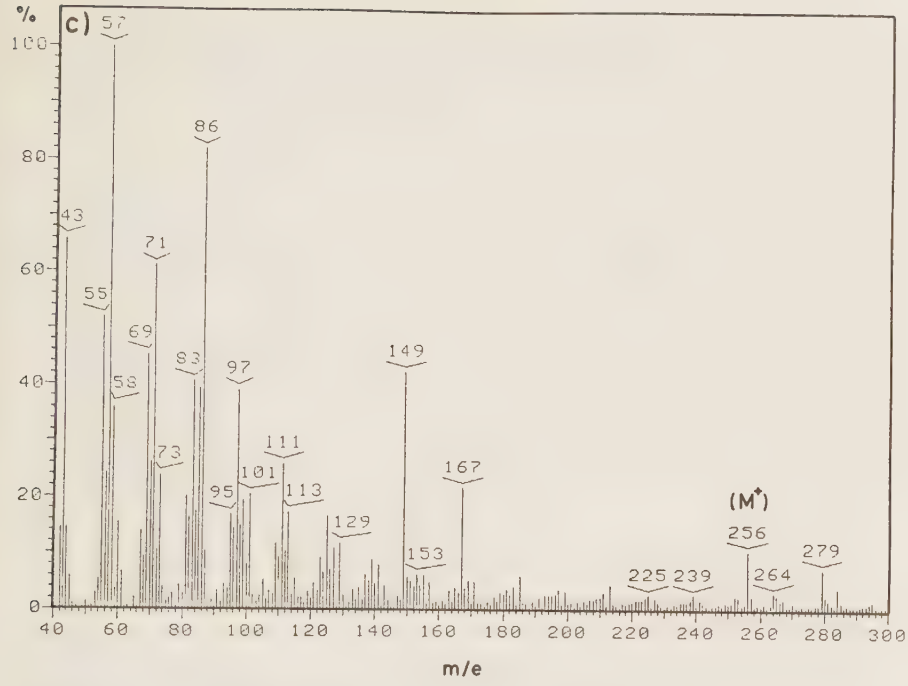
Abb. 29 : Massenspektrum von gebundenem Sulfid und Schwefelblüte

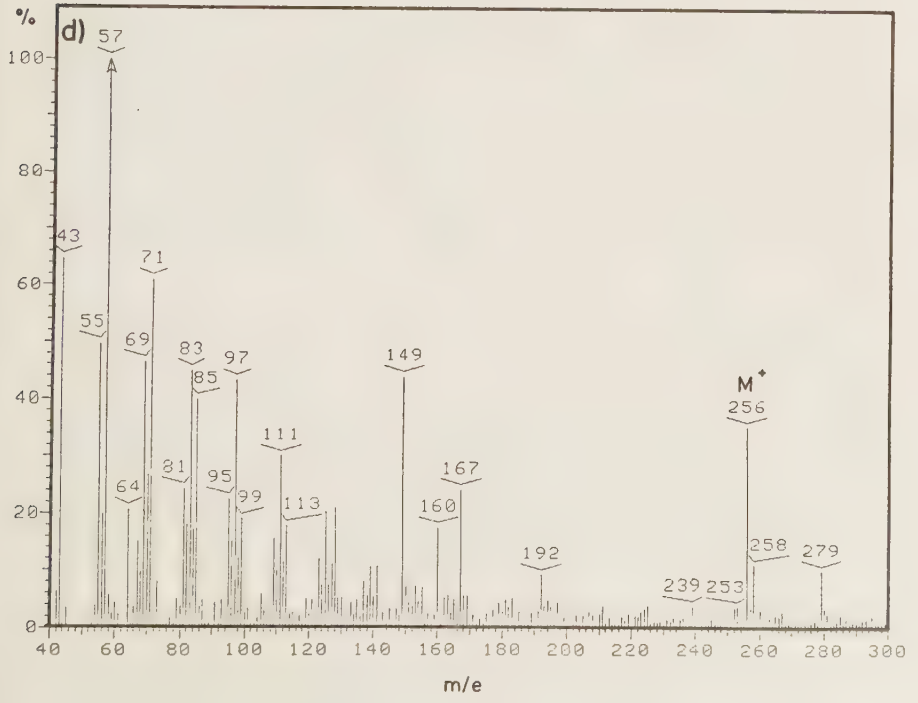
a) käufliche Schwefelblüte
b) Methanolextrakt einer auf Sulfatmedium gewachsenen Chlorella-kultur, der bei der Aufreinigung 2.4.2.1 Schwefelblüte zugesetzt worden war.
c) Methanolextrakt einer auf Sulfat gewachsenen Chlorellakultur
d) Methanolextrakt einer Chlorellakultur, die auf L-Cysteinäthylester und Sulfat gewachsen war.

Die relative Häufigkeit bezieht sich bei a + b auf S_2 64 m/e und bei c + d auf das häufigste Fragment 57 m/e.
Es wurde die Äthylacetatfraktion nach Laufmittel 3 eingesetzt.


a)
%
100
80
60
40
20
0
64
66
96
98
128
130
160
162
192
194
224
256
M+
258
260
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300
m/e


b)
%
100
80
60
40
20
0
64
57
43
55
71
83
85
97
73
86
96
111
128
130
140
160
162
167
192
194
224
256M+
258
260
279
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300
m/e


%
c)
57
86
43
71
55
69
83
58
97
149
73
111
101
167
95
113
129
(M+)
256
153
279
225 239
264
100
80
60
40
20
0
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300
m/e


%
d)
57
43
71
55
69
83
97
85
149
111
M+
256
81
95
64
99
167
113
160
192
258
279
239 253
100
80
60
40
20
0
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300
m/e

entspricht. Die Fragmente von Schwefelblüte sind bekannt und wurden der Kontrolle wegen mit käuflicher Schwefelblüte nachbestimmt (Abb. 29a). Dabei treten neben dem M^+-Ion von 256 m/e noch die Hauptfragmente 224 m/e, 192 m/e, 160 m/e, 128 m/e, 96 m/e und 64 m/e auf, die den S_7 bis S_2-Fragmenten zuzuordnen sind. Setzt man diese Hauptfragmente des gebundenen Sulfids in Relation zueinander, so betragen sie von 256 m/e - 64 m/e 100 %, 84 %, 3,2 %, 36 %, 53 %, 64 %, 22 % und 100 %. Da S^o ein M+2-Element ist, können die anderen Peaks als Fragmente der Molekülmasse 258 m/e zugeordnet werden. Da nun die Petrolätherfraktion noch weitere Fragmente enthielt, galt es, sie als Verunreinigung zu identifizieren. Dazu ließ man Chlorellakulturen nur auf einem sulfathaltigen Medium (2.1.1.1 ; 2 x 10^{-4} M) wachsen, wobei kein elementarer Schwefel gebildet werden sollte, da kein Schwefelwasserstoff nachgewiesen werden kann (2.2.8.1). Die geernteten Zellen wurden in der üblichen Weise extrahiert (2.4.1). Danach gab man zu der einen Hälfte etwas Schwefelblüte, um sicherzustellen, daß der Aufreinigungsgang wirklich elementaren Schwefel erfaßt. Dabei ist zu beachten, daß die S^o-freie Kontrolle bei der Dünnschichtchromatographie keine UV-Bande enthält, so daß die Gelregion in der S^o gelaufen wäre, nur durch seitliches cochromatographieren von gebundenem Sulfid ermittelt werden kann.

Die Spektren der beiden Kontrollen sind in Abb. 29 c und d dargestellt. Die schwefelhaltige Kontrolle enthält wirklich die bekannten Fragmente, so daß S^o beim Reinigungsgang nicht verändert wurde. Die schwefelfreie Kontrolle zeigt dagegen nur die Fragmente der Verunreinigungen mit den Hauptpeaks bei 43 m/e, 57 m/e, 71 m/e, 83 m/e, 97 m/e, 111 m/e, 149 m/e und 167 m/e. Zieht man nun das Spektrum dieser Kontrolle (Abb. 29c) von dem des gebundenen Sulfids (Abb. 29d) ab, so ergibt sich das typische S^o-Spektrum (Abb. 29a). Es sei noch erwähnt, daß das Spektrum der Kontrolle (Abb. 29c) auch einen Peak bei 256 m/e aufweist. Die Petrolätherfraktion enthält somit elementaren Schwefel.

Im folgenden sollen die Eigenschaften des gebundenen Sulfids beschrieben werden, die seine Natur als elementarer Schwefel untermauern können. Die Löslichkeit des isolierten gebundenen Sulfids stimmt mit der von elementarem Schwefel überein. Er löst sich nicht in Wasser, schlecht in Chloroform und Benzol , etwas besser in heißem Methanol, Äthanol und n-Hexan. Eine gute Löslichkeit kann in Äthylacetat, Petroläther und besonders in Schwefelkohlenstoff beobachtet werden , die bei letzterem im Gegensatz zu allen anderen Lösungsmitteln (um 0,5%) bei Raumtemperatur bis zu 41 % (w/v) gehen kann (MEYER 1957).

Das Absorptionsspektrum (Abb. 30) des gebundenen Sulfids ist dem von Schwefelblüte identisch und weist ein relatives Maximum bei λ_{max} von 263 nm auf, wozu ein $\varepsilon_{263\ nm}$ von 3,29 cm^2 x mol^{-1} in Methanol bestimmt werden kann.

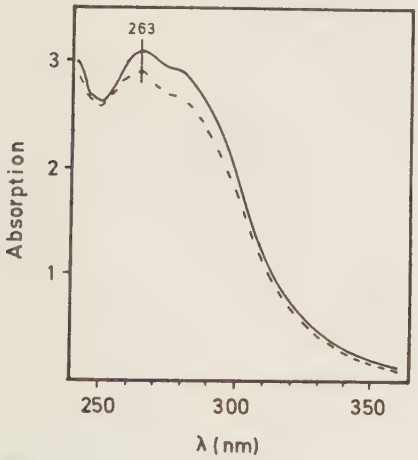


Abb. 30 :

UV-Vis-Spektrum von gebundenem Sulfid und elementarem Schwefel

——— Methanolextrakt mit gebundenem Sulfid

– – – Schwefelblüte gelöst in Methanol

In allen verwendeten Dünnschichtchromatographie-Laufmittelsystemen wird ein gleiches Verhalten von gebundenem Sulfid und S^o beobachtet (Abb. 31). Dabei können sie durch UV-Löschung bei 254 nm wie auch durch Ansprühen mit Rhodamin 6B (2.3.1) als roter Fleck auf pinkem Hintergrund oder mit einer Natriumazid-haltigen Jodlösung als weißer Fleck auf gelb-braunem Hintergrund (2.3.1) nachgewiesen werden.
Auch das Laufverhalten in der RP-HPLC (2.3.5) ist bei Detektion über UV-Löschung oder nach chemischer Reaktion (2.2.8.1) gleich (Abb. 32).

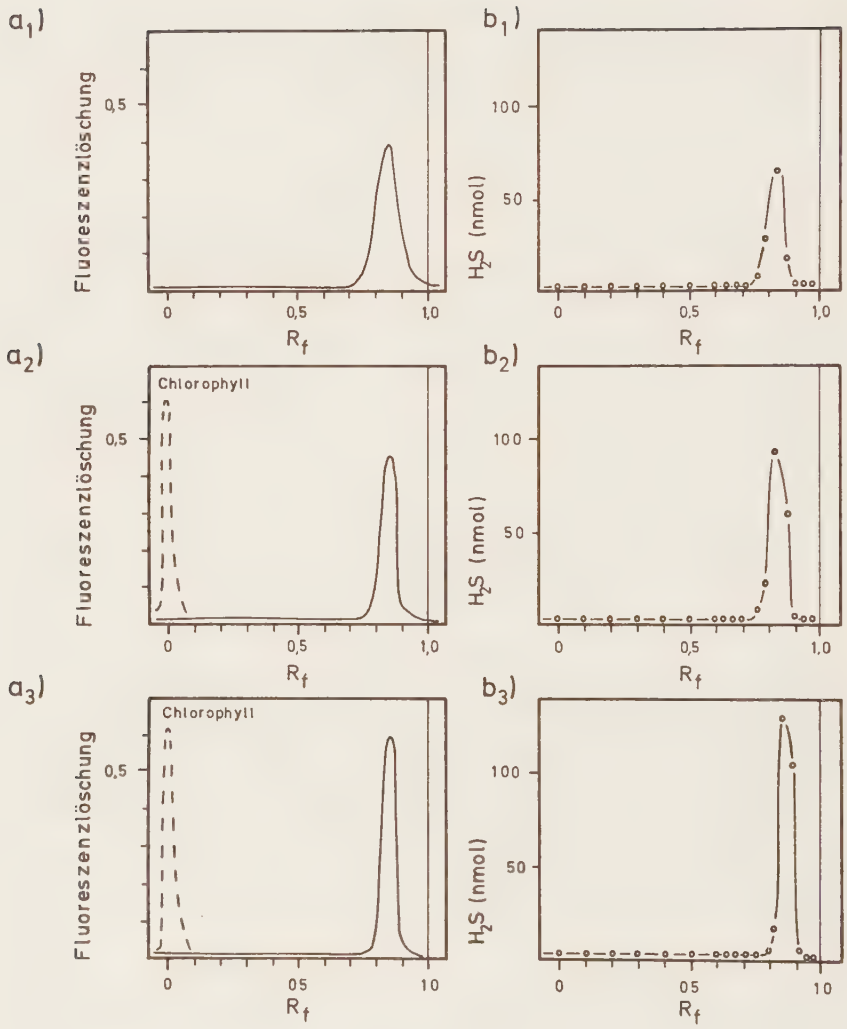


Abb. 31 : Dünnschichtchromatographie von gebundenem Sulfid, das mit heißem Methanol extrahiert wurde.

Die Trennung erfolgte auf einer Kieselgel-GF_{254}-Platte (0,25 mm) mit dem Laufmittel Petroläther (Sdp. 40 - 65°C)/Diäthyläther (99,5/0,5).

a) Nachweis durch UV-Löschung (2.3.1); b) H_2S-Produktion (2.2.8.1).

1) Methanolextrakt einer auf Sulfat gewachsenen Chlorella-Kultur, der Schwefelblüte zugesetzt wurde

2) Methanolextrakt einer auf Cysteinäthylester gewachsenen Chlorella-Kultur

3) Cochromatographie von 1) und 2).

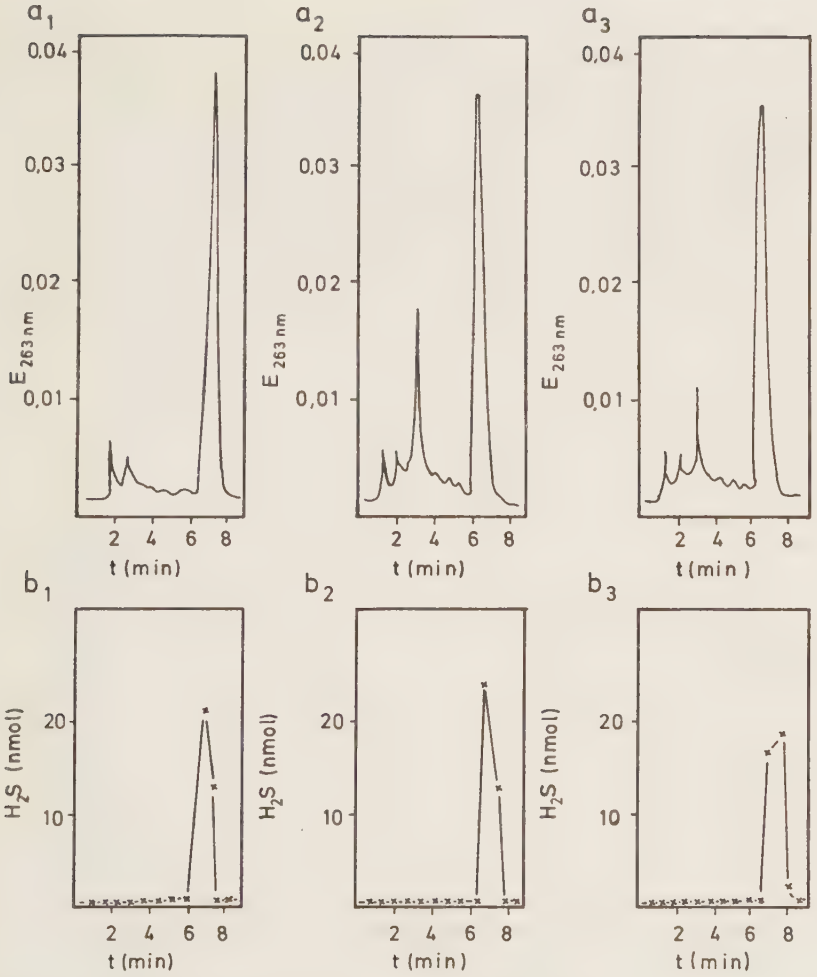


Abb. 32 : Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) von gebundenem Sulfid, das mit heißem Methanol extrahiert wurde.

Die Trennung erfolgte an einer "stainless steel" Säule (4 x 250 mm), die mit µ-Bondapack-C_8 (Merck) gepackt war. Das Laufmittel war Methanol/Wasser (85/15 ; v/v), die Flußrate 1,5 ml/ min. bei 22°C. Die Trennung und der Nachweis erfolgten nach 2.3.5 und 2.2.8.1 über Methylenblau.

a) Nachweis durch UV-Löschung (2.3.1); b) H_2S-Produktion (2.2.8.1).

1) Methanolextrakt einer auf Sulfat gewachsenen Chlorella-Kultur, der Schwefelblüte zugesetzt wurde

2) Methanolextrakt einer auf Cysteinäthylester gewachsenen Chlorella-Kultur

3) Cochromatographie von 1) und 2).

3.5.4 Biochemische Reaktionen

Nachdem nun die chemische Struktur und die Eigenschaften von gebundenem Sulfid bekannt sind, galt es, seine Biochemie näher zu untersuchen. Dabei ist besonders die Kinetik der Schwefelbildung von Interesse. Die Ergebnisse der Abb. 33 wurden mit Kulturen gewonnen, die auf 2 x 10^{-4} M Sulfat und 3 x 10^{-4} M L-Cysteinäthylester in einer 10 l Flasche in batch-Kultur wuchsen (2.1.1.1). Ihr Gehalt an gebundenem Sulfid wurde nach der angegebenen Zeit bestimmt (2.2.8.1), indem ganze Zellen und nicht ein Methanolextrakt verwendet wurde.

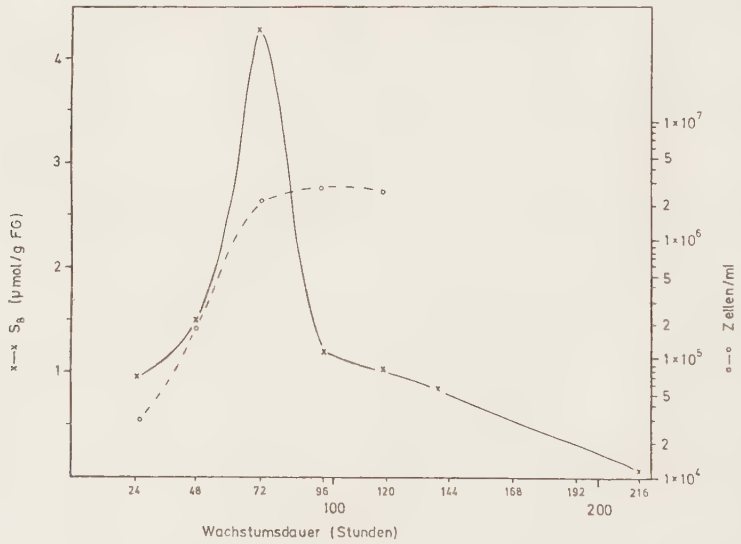


Abb. 33 : Bildung von gebundenem Sulfid beim Wachstum auf L-Cysteinäthylester und Sulfat von Chlorella

Chlorella wuchs auf 2 x 10^{-4} M Sulfat und 3 x 10^{-4} M L-Cysteinäthylester in einer 10 l batch-Kultur (2.1.1.1). Nach der angegebenen Zeit wurden die Zellen abzentrifugiert und in einem dreifachen Volumen mit 20 mM Tris-HCl pH 8 / 0,1 M $MgCl_2$ aufgenommen. Das gebundene Sulfid wurde in einem Testansatz bestimmt, der 100 µmol Tris-freie Base, 2 µmol DTE und soviel ganze Zellen wie nötig, meist 900 µl, in einem 1 ml Endvolumen enthielt. Die Inkubation erfolgt 30 Minuten bei 37°C. Der gebildete Schwefelwasserstoff wurde nach 2.2.8.1 als Methylenblau bestimmt.

In einem anderen Versuch wurde eine Chlorellakultur, die sich, auf Sulfat allein gezogen, in der mittleren logarithmischen Phase befand, Cysteinäthylester zugesetzt und die Kinetik der Bildung von gebundenem Sulfid (S) verfolgt. nach ca. 8 Stunden kann zum ersten Mal Schwefelwasserstoff zweifelsfrei bestimmt werden, wenngleich schon füher Extinktionen bei 670 nm gemessen werden können, die aber kein typisches Methylenblauspektrum (3.1.3) aufweisen.
Es sei noch darauf hingewiesen, daß auch ohne Thiolzusatz (Kontrolltest 2.2.8.1-DTE) Methylenblau auftritt, über dessen Herkunft noch in der Diskussion eingegangen wird.
In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, aus welcher S-Quelle des Kulturmediums der elementare Schwefel stammen könnte. Da (^{35}S)-L-Cystein-

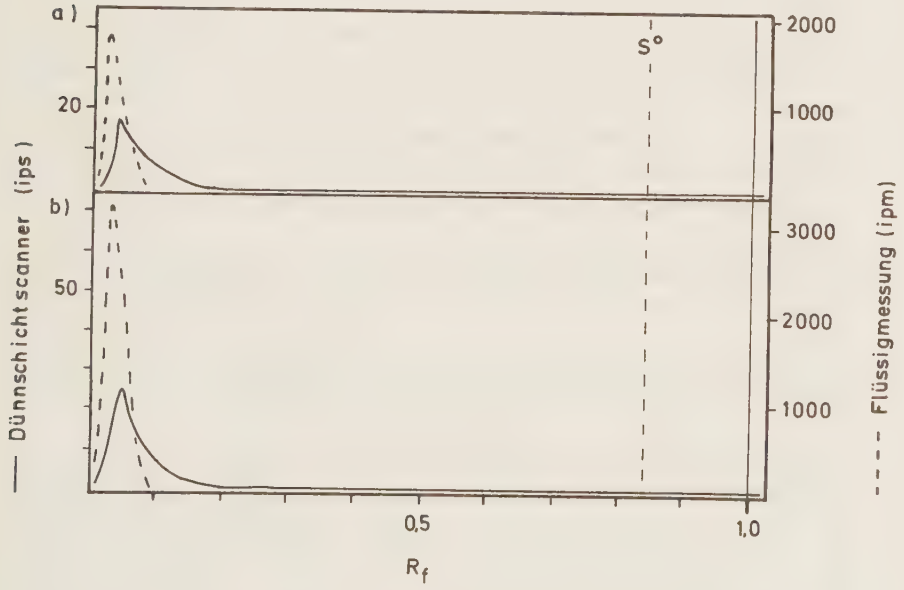


Abb. 34 : Dünnschichtchromatographie eines (^{35}S)-markierten Methanolextraktes

Der Extrakt wurde wie im Text beschrieben gewonnen und vollständig aufgetragen. Nach der Trennung im Laufmittel Petroläther (Sp. 40 - 65°C)/Diäthyläther (99,5/0,5 ; v/v) wurde die Kieselgel GF_{254}-Platte mit einem Dünnschichtscanner durchgemessen (2.3.1). Danach wurde das Gel zu je 0,5 cm breiten Streifen abgekratzt, mit Methanol eluiert und die Radioaktivität bestimmt (2.2.9).

——— Radioaktivität am Endfenster (DC-Scanner) — — — Radioaktivität der Gelstreifen

a) Wachstum auf L-Cysteinäthylester und Sulfat b) Wachstum auf Sulfat

äthylester nicht käuflich ist, konnte nur ein indirekter Nachweis mit (^{35}S)-Sulfat durchgeführt werden. Dazu wuchsen die Zellen (400 ml) in 1 l Gaswaschflaschen heran, deren Gasraum mit Pressluft in eine zweite Gaswaschflasche überführt wurde, die 200 ml 0,1 M Zinkacetatlösung enthielt, um das gebildete Sulfid auszufällen. Das Medium enthielt 2 x 10^{-4} M (^{35}S)-Sulfat (1725 ipm/nmol) und 3 x 10^{-4} M L-Cysteinäthylester, wobei der Ester und das tracerfreie Sulfat nach dem Autoklavieren mittels Sterilfiltration zugegeben wurden. Als Kontrolle gilt eine Kultur, die nur (^{35}S)-Sulfat enthielt. Nachdem die Kulturen eine optische Dichte bei 680 nm von 0,3 erreicht hatten, wurden sie in der üblichen Weise (2.4.1) mit Methanol extrahiert und im DC-System 1 (Tab. 27) chromatographiert. Anschließend wurde die Radioaktivität mittels DC-Scanner (2.3.1) ermittelt und in 0,5 cm großen Streifen abgekratzt, mit Methanol eluiert und sowohl auf Radioaktivität (2.2.9) wie auch auf Schwefelgehalt (2.2.8.1) quantitativ bestimmt. Abb. 34 zeigt, daß die gesamte Radioaktivität am Start bei beiden Kulturen liegen bleibt, während ein UV-löschendes Material beim Versuch mit L-Cysteinäthylester im Bereich des elementaren Schwefels zu finden ist. Diese Menge war aber zu gering, um nach 2.2.8.1 quantifiziert werden zu können. Chlorella bildet somit elementaren Schwefel aus dem L-Cysteinäthylester, was auch schon aus den Wachstumsversuchen (Tab. 28) geschlossen werden kann.
Nachdem nun einige in vivo Daten auf einen Metabolismus des elementaren Schwefels schließen lassen, soll auch in vitro ein möglicher Abbauweg untersucht werden.

Tab. 28 : Bildung von Cystein durch die Reaktion von elementarem Schwefel mit Dithioerythritol (DTE) und Cysteinsynthase

Test	DTE	Na_2S	gebundenes Sulfid	OAS	Cysteinsynthase	gebildetes Cystein (nmol)
a)	+	+	-	+	+	360 nmol
b)	+	+	+	+	-	10 nmol
c)	+	+	+	-	-	20 nmol
d)	-	-	+	+	+	41 nmol
e)	+	-	+	+	+	158 nmol
f)	+	+	+	+	+	360 nmol

Das gebildete Cystein wurde in einem Endvolumen von 1 ml mit 100 µmol Tris-HCl pH 7,5; 2 µmol DTE; 5 µmol Natriumsulfid; 5 µmol O-Acetyl-L-Serin (OAS); 189 nmol gebundenes Sulfid aus Chlorella und einer Cysteinsynthase aus Spinat (640 µg Protein; nach SCHMIDT 1977a gereinigt) nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 37°C mit dem sauren Ninhydrinreagenz (2.2.3.2) bestimmt.

Dies gelang durch die Bildung von Cystein, wobei im Test der Cysteinsynthase (2.5.1) statt Schwefelwasserstoff elementarer Schwefel eingesetzt wurde. Die in Tab. 28 dargestellten Ergebnisse lassen sich sowohl mit Rohextrakten von Chlorella wie auch teilweise gereinigten Cysteinsynthasen aus Chlorella und Spinat erzielen. Es kann eindeutig gezeigt werden, daß die Cysteinbildung von O-Acetylserin und S^o nur in Gegenwart von Thiolen wie DTE erfolgen kann (Tab. 28e). Die Kontrollteste (Tab. 28 b - d) zeigen, daß die Petrolätherfraktion von gebundenem Sulfid keinen Schwefelwasserstoff (d), kein O-Acetylserin (c) und keine Cysteinsynthase (b) enthält, da hier kaum Cystein beobachtet werden kann. Aus Versuch (f) geht hervor, daß die Menge an eingesetztem gebundenem Sulfid nicht sättigend ist, da erst durch Zusatz von Sulfid die maximale Menge an Cystein gebildet wird, wie dies aus dem normalen Cysteinsynthase-Test mit Sulfid (a) hervorgeht.
Berechnet man das Verhältnis von Sulfid/Thiocyanat/Cystein, die von der gleichen Menge an gebundenem Sulfid gebildet werden, so ergibt sich ein Verhältnis von 1,05 / 1 / 1,05. Wenngleich auch in vivo kein DTE zur Reduktion des gebundenen Sulfids zur Verfügung steht, kann Cystein oder Glutathion, wie aus Tab. 29 bekannt ist, Sulfid aus S^o freisetzen, welches dann von der Cysteinsynthase mit O-Acetylserin zu Cystein reagieren kann.

Tab. 29 : Reaktion von elementarem Schwefel mit verschiedenen Thiolen

Thiolzugabe	Methylenblau-Bildung aus H_2S in Gegenwart von Thiolen		Methylenblau-Bildung aus S^o in Gegenwart von Thiolen		Schwefelwasserstoff-Bildung aus S^o	
	$E_{670\ nm}$	%	$E_{670\ nm}$	%	(nmol)	%
Dithioerythritol (DTE)	1,320	100 %	1,289	100 %	97,6	100 %
1,2-Dimercaptopropanol (BAL)	1,243	94 %	1,243	94 %	97,5	99 %
2-Mercaptoäthanol (ME)	0,550	42 %	0,462	36 %	84,0	86 %
Glutathion (GSH)	0,473	36 %	0,383	30 %	80,9	83 %
L-Cystein (Cys)	0,345	26 %	0,361	28 %	104,6	107 %
ohne Thiol	0,743	56 %				

Der Versuch wurde in einem Endvolumen von 1 ml mit 100µmol Tris-HCl pH 9,0 ; 2 µmol des angegebenen Thiols , gelöst in 20 mM Tris-HCl pH 9,0, und 110 nmol S^o (3,5 µg Schwefelblüte, gelöst in 100 µl Methanol) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei 37°C . Das gebildete Methylenblau wurde nach 2.2.1.8. bestimmt. Die Methylenblaubildung aus H_2S geschah mit dem Eichwert 100nmol Schwefelwasserstoff , der in 1 mM EDTA gelöst war und statt des elementaren Schwefels eingesetzt wurde.

3.5.5 Diskussion

Wenn man nun die vorliegenden Ergebnisse diskutieren will, muß man den Begriff "gebundenes Sulfid" genauer definieren. Wie gezeigt, handelt es sich bei Chlorella um drei Fraktionen, die entweder wasserlöslich oder petrolätherlöslich oder methanolunlöslich sind. Wenn auch im Laufe der Untersuchungen dieses Kapitels nur die Petrolätherfraktion, die aus elementarem Schwefel besteht, näher untersucht wurde, so wird in der übrigen Arbeit, der Übersichtlichkeit wegen, bewußt vereinfachend von gebundenem Sulfid gesprochen.
Wie aus Tab. 18 hervorgeht, bildet Chlorella beim Wachstum auf Cystein- und Cystinestern z.B., gewisse Mengen von gebundenem Sulfid, dessen Hauptteil in der Methanolphase zu finden ist. Um die Ausbeuten von gebundenem Sulfid quantifizieren zu können, verwendete man Methanol als Extraktionsmittel, da sich hier die hydrophile und hydrophobe Fraktion lösen, was in Schwefelkohlenstoff nicht erzielt werden kann. Die weiteren Aufreinigungsversuche wurden nur mit der Petrolätherfraktion durchgeführt, da die anderen Fraktionen in geringeren Mengen anfielen und meist noch viele Verunreinigungen aufwiesen. Deshalb können nur vage Vermutungen über deren chemische Natur angestellt werden. Die wasserlösliche Fraktion ist in Schwefelkohlenstoff unlöslich und kann auf einem Papierchromatogramm mit dem Laufmittel Äthylacetat/Pyridin/Wasser (50/25/15) von dem in Petroläther löslichen Sulfid, welches mit der Front lief, getrennt werden (R_f = 0,66). Auch die zum Nachweis verwendeten Methoden mit DTE (2.2.8.1) und Cyanid (2.2.8.2) liefern aufgrund der Unspezifität der Teste (3.1.2 und 3.1.3) nur vage Hinweise.
Bei der hydrophilen Fraktion könnte es sich um Polysulfide, Polythionate oder flüssigen Schwefel (S_μ) handeln. Gerade diese allotrope Form des elementaren Schwefels muß in Erwägung gezogen werden, da sich S_μ nicht in Schwefelkohlenstoff löst (MEYER 1964, PINKUS et al. 1957, STEUDEL 1981) und nur unter gewissen Bedingungen als "supercooled liquid sulfur" bei Raumtemperatur bis zu 4 Tage existieren kann (DAS und DAS GUPTA 1939). Es könnte sich dabei um die sogenannte Odénsche Schwefelsohle mit der Zusammensetzung $H_2S_xO_6$ handeln. wobei lineare S-Ketten mit bis zu 140 S-Atomen bei einem Molekulargewicht von 18000 bis 78000 beobachtet werden (WEITZ et al. 1956). Diese Vermutung wird auch durch die Untersuchungen von HAGEAGE et al. (1970) untermauert, die in phototrophen Bakterien flüssigen Schwefel nachgewiesen zu haben glauben (Tab. 30).
Die chemische Natur der methanol-unlöslichen Fraktion liegt noch mehr im Dunkeln. Ob es sich dabei um biologisch gebildete Polythionate oder andere

Sulfide handeln könnte, ist zweifelhaft. Man möchte eher auf Artefakte schließen, welche durch Eisen-(III)-Ionen, die im Medium enthalten sind (90 µM), verursacht sein können.
Eine Denkmöglichkeit stellt die Reaktion von Fe^{3+}-Ionen mit Thiolen dar, die zu einer Freisetzung von Schwefelwasserstoff ($E_{670\ nm}$ im Test 2.5.7 bis zu 0,3) führen kann (BIEDLINGMAIER et al. 1984, BACCANARI 1978, SAKURAI et al. 1982). Diese Reaktion läuft bevorzugt im Alkalischen nach folgender Gleichung für unsere Testbedingungen (2.5.7) ab (59) : X = unbekanntes Produkt

$$DTE_{red} + Fe/EDTA \xrightarrow{O_2} H_2S + X + Fe/EDTA \quad (59)$$

Zu dieser Reaktion reichen die Eisenverunreinigungen, die als Eisenniederschlag des Mediums verschleppt sein können, aus. Zudem kann bei der Reaktion von Cysteinderivaten wie auch Cysteinäthylester in Gegenwart vom $Eisen^{3+}$-EDTA-Komplex Schwefelwasserstoff freigesetzt werden, der eine biologische Schwefelwasserstoffreisetzung durch die Algen vorzutäuschen scheint.
Daher erreicht Cystein (10 mM) eine optische Dichte von 0,4 und Cysteinmethyl- bzw.-äthylester von 1,3 (BIEDLINGMAIER et al. 1984).
Wenn man im Folgenden die chemische Struktur der Petrolätherfraktion als elementaren Schwefel mit einer großen Anzahl von Methoden nachweist, so geschieht dies nur deshalb, weil die Ergebnisse vieler Autoren nur mit 2 Standardverfahren, der Reaktion von DTE (2.2.8.1) zu Schwefelwasserstoff oder von Cyanid (2.2.8.2) zu Thiocyanat, abgesichert werden.
Das hydrophobe gebundene Sulfid zeigt in allen verwendeten Lösungsmitteln und Dünnschichtsystemen (Tab. 27) ein gleiches Verhalten wie käufliche Schwefelblüte (S^o), wobei die R_f-Werte einiger Trennsysteme aus der Literatur bekannt sind (PEZET und PONT 1977,DAVIES und THURASHINGHAM 1968). Das Laufmittel 1 trennt alle Chlorophylle und Carotinoide ab, während Laufmittel 2 alle Lipide eluiert, die auch UV-löschend sind und mit Rhodamin-6B angefärbt werden. Durch diese Vortrennung können die Sprühreagentien erst zu eindeutigen Ergebnissen führen.
Die chemischen Nachweise mit Cyanid oder Thiolen sind wohl zur schnellen Bestimmung von gebundenem Sulfid geeignet, doch liefern sie keine eindeutigen Aussagen zur chemischen Struktur, da sie unspezifisch sind (3.1.2/3).
Zusammenfassend soll nochmal erwähnt werden, daß die Thiocyanatbildung bei 80^o C (2.2.8.2) auch mit Thiocystin (FLETCHER und ROBSON 1963), Thiocystein (FLAVIN 1962), Polysulfiden, Polythionaten, Disulfiden und Tetrasulfiden möglich ist (FOSS 1950).

Ein anderes Nachweisverfahren stellt der nucleophile Angriff von Thiolen auf elementaren Schwefel dar, der eine Inkubationszeit von 15 - 20 Minuten bei 37° C hat (2.2.8.1 ; HYLIN und WOOD 1959, SAKURAI et al. 1982). Die vorliegenden Ergebnisse (Tab.29) zeigen, daß Dithiole, wie DTE und BAL, effektiver als Monothiole sind. Auch biologische Thiole, wie GSH und Cystein, können S^o zu Schwefelwasserstoff umsetzen. Der anschließende Nachweis mit Methylenblau wird aber auch von großen Mengen Thiosulfat und Cystein wie auch von GSH und ME gestört (SIEGEL 1965). Zudem findet nach unseren eigenen Untersuchungen eine geringe Reaktion mit DTE (2 mM) statt.

Die Absorptionsspektren von gebundenem Sulfid und Schwefelblüte weisen in Methanol das gleiche relative Maximum bei 263 nm auf (NASHEF et al. 1977, ELBANOWSKI und WOJTCZAK 1978), welches auch in anderen Lösungsmitteln, wie Äthanol, Aceton, Chloroform oder n-Hexan, n-Heptan, zu beobachten ist DAVIS und NAKSHBENDI 1962). Da Polysulfide kein relatives Maximum in diesem Bereich aufweisen, können sie ausgeschlossen werden (BAER und CARNACK 1949). Es sei noch darauf hingewiesen, daß elementarer Schwefel nach längerem Stehen in methanolischer Lösung durch Licht (λ = 254 nm) zum Photoaddukt Dimethylsulfid und anderen Verbindungen reagiert, so daß ältere Extrakte nicht mehr zu Referenzzwecken geeignet sind, was auch am veränderten Laufverhalten auf der DC beobachtet werden kann (ELBANOWSKI 1978).

Am überzeugensten sind die Ergebnisse der Massenspektrometrie, die gebundenes Sulfid nach Abzug der Verunreinigungen (Abb. 29 d minus c) als elementaren Schwefel identifizieren. Das dabei beobachtete Fragmentmuster und das Molekülion von 256 m/e sind für elementaren Schwefel typisch (MEYER 1964). Es dürfte sich um die häufigste und die bei Raumtemperatur stabilste Form von elementaren Schwefel handeln, die als orthorhombischer Schwefel (S_α) bezeichnet wird, da sie nur in organischen Lösungsmitteln löslich ist (MEYER 1964). Die Einwendungen von HAGEAGE et al. (1970), die in vivo andere instabilere Modifikationen von S^o annehmen, welche bei der Aufreinigung zu S_α abreagieren sollen (MEYER 1964), können aufgrund der durchgeführten Versuche nicht entkräftet werden.

Andere Methyl-gruppenhaltige cyclische Polysulfide, wie sie in letzter Zeit häufiger aus Pflanzenmaterial isoliert wurden, kommen aufgrund der Fragmentmuster und des Molekülions nicht in Frage (ANTHONI et al. 1980, GMELIN et al. 1981, MOORE 1971, STEUDEL und ROSENBAUER 1981, WRATTEN und FAULKNER 1976).

Überblickt man die Literatur über das Vorkommen von elementarem Schwefel (Tab. 30) in biologischem Material, so wird in dieser Arbeit zum ersten Mal S^o für Grünalgen beschrieben, wobei aber nicht vergessen werden darf, daß

Chlorella nicht auf einer natürlichen S-Quelle gezogen wurde.
Elementarer Schwefel kann entweder intrazellulär, wie z.B. bei den Chromatiaceae mit Ausnahme von Ectothiorhodospira, von einer Proteinmembran umgeben (SCHMIDT et al. 1971, KRAN et al. 1963, NICOLSEN und SCHMIDT 1971), abgelagert werden. Diese enthält hauptsächlich Protein mit einem Molekulargewicht von 13 500, welches mit dem S^0-Metabolismus in Verbindung gebracht wird (SCHMIDT et al. 1971). Die Rhodospirillaceae und Chlorobiaceae sowie die Gattung Ectothiorhodospira scheiden dagegen S^0 ins Medium ab (Tab. 30). Dabei muß ein Transport von membran-umhüllten Schwefelkügelchen stattfinden, den PUCHKOVA et al. (1975) und GORLENKO und ZHILINA (1968) in Form einer Evagination der Cytoplasmamembran annehmen. Über die allotropen Modifikationen in vivo liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Während TRÜPER und HATHAWAY (1967) orthorhombischen Schwefel(S_α) nachgewiesen haben (LA RIVIÈRE 1963), halten HAGEAGE et al. (1970) dies eher für Isolationsartefakte von labilem flüssigem Schwefel (S_μ), den sie mittels Röntgenstrahlenbeugung nachwiesen.
Quantitative Angaben über den Gehalt an S^0 liegen nur für zwei Organismen vor, wo sie zwischen 0,2 % und 34 % (Trockengewicht) schwanken (Tab. 30).
In Chlorella konnten bis zu 18 µmol gesamtgebundenem Schwefel/mg Chlorophyll bestimmt werden. Es sei noch am Rande erwähnt, daß sich S^0 auch in Lipidschichten lösen kann, da der Gehalt an S^0 in Leinsamenöl zu 0,6 % (w/v, 30°C), in Olivenöl zu 4,33 % (w/v, 30°C) und in Lanolin zu 0,4 % (w/v, 45°C) ermittelt wurde (LINKE 1965, MEYER 1977).
Betrachtet man die Bildung von gebundenem Sulfid, so muß bedacht werden, daß es sich bei der in Abb. 33 dargestellten Kinetik um die absolute Menge von gebundenem Sulfid handelt, die bei der Reaktion von ganzen Zellen mit DTE freigesetzt wird. Es wäre falsch, sie als Kinetik der Bildung von elementarem Schwefel anzusprechen. Zudem wurden die Versuche im batch-Maßstab durchgeführt. Deshalb können nur bei den Kurzzeitversuchen steady-state-Bedingungen herrschen, die für Regulationsversuche notwendig sind. Dabei fallen die hohen Werte von Schwefelwasserstoff ohne Zugabe von Thiolen auf, die auf eine nicht enzymatische Reaktion von Cysteinäthylester mit dem Fe^{3+}-Ion des Mediums zurückgeführt werden können.
Es ist nicht leicht zu verstehen, warum Chlorella S^0 nur beim Wachstum auf Cysteinestern und nicht auf Cystein allein anhäuft. Es wäre denkbar, daß der Ester von der Zelle als solcher nicht erkannt werden kann und deshalb ohne regulatorische Rückkopplung, wie dies bei Cystein beobachtet wird, in eine Zelle gebracht werden kann. Auch dürfte der unterschiedliche pK-Wert beider Ver-

Tab. 30 : Vorkommen von elementarem Schwefel

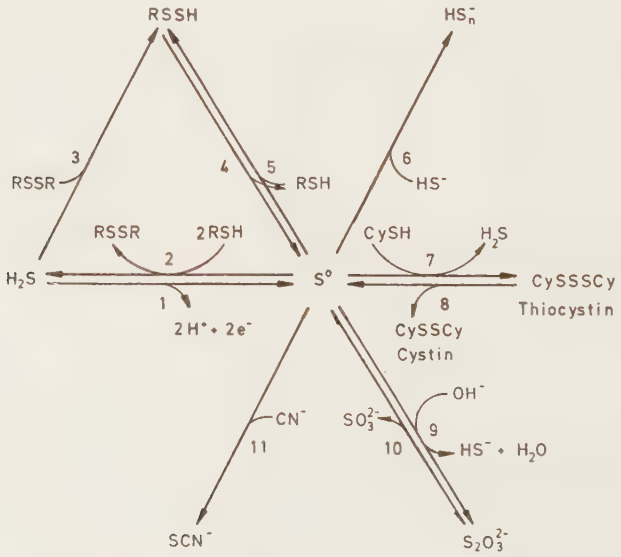
Organismus		Literaturnachweis		wo	Modifikation
Phototrophe Bakterien					
Rhodospirillaceae					
Rhodopseudomonas capsulata	SMG 155	HANSEN und VAN GEMERDEN	1972	e	
palustris	SMG 124	HANSEN und VAN GEMERDEN	1972	?	
sphaeroides	SMG 158	HANSEN und VAN GEMERDEN	1972	e	
spec.	51	HANSEN et al.	1975	e	
sulfidophila		HANSEN und VELDKAMP	1973	e	
Rhodospirillum rubrum	SMG 107	HANSEN und VAN GEMERDEN	1972	e	
G		VAN NIEL	1936	?	0,6 % des TG
Chromatiaceae					
Chromatium 8111 =	SMG 176	TRÜPER und HATHAWAY	1967	1	S_α
buderi		REMSEN und TRÜPER	1973	1	
okenii		HAGEAGE et al.	1970	1	S_μ
"		KRAN et al.	1963	1	
"		TRUPER	1964	1	
vinosum D	DSM 185	BREUKER	1964	1	
"		HAGEAGE et al.	1970	i	S_μ
"		HENDLEY	1955	1	
"		NICOLSEN und SCHMIDT	1971	i	sem1 S_μ
"		SCHMIDT und KAMEN	1970	1	
"		SCHMIDT et al.	1971	1	
"		VAN GEMERDEN und BEEFTINK	1981	i	
" = 6412		VAN GEMERDEN	1968	i	
"		VAN NIEL	1931	?	
"		VAN NIEL	1936	1	34 % des TG
"		WINOGRADSKY	1887	i	
warmingii		HAGEAGE et al.	1970	i	S_μ
weissei		HAGEAGE et al.	1970	i	S_μ
Ectothiorhodospira abdelmalekii		TRÜPER	1982	e	
halochloris		TRÜPER	1982	e	
mobilis		TRÜPER	1968	e	
Thiocapsa roseopersecina		TRÜPER	1982	i	
Thiocystis spec.		VAN NIEL	1931	i	
violaceus	8311	TRÜPER und HATHAWAY	1967	i	S_α
Thiospirillum jenense		HAGEAGE et al.	1970	i	
"		TRÜPER und HATHAWAY	1967	i	S_α
Chlorobiaceae					
Chlorobium limnicola f. thio-	DSM 249	HAGEAGE et al.	1970	?	
sulfatophilum		TRÜPER	1982	?	
"		VAN GEMERDEN und BEEFTNICK	1981	e	
vibrioforme		PUCHKOVA et al.	1975	i → e	
8430		TRÜPER und HATHAWAY	1967	e	S_α
Pelodictyon luteolum		PUCHKOVA et al.	1975	1 → e	
phaeum		PUCHKOVA et al.	1975	1 → e	
Prostecochloris		GORLENKO und ZHILINA	1968	?	
Chloroflexaceae					
Chloroflexus aurantiacus		MADIGAN und BROCK	1975	e	amorph

Tab. 30 : Fortsetzung

Organismus	Literaturnachweis		wo	Modifikation
Blaualgen				
Oscillatoria limnetica	COHEN et al.	1975	e	
"	HINZE	1903	i	
"	NAKAMURA	1937	?	
salina	GARLICK et al.	1977	e	
Aphanotheca halophytica	GARLICK et al.	1977	e	
Phormidium (Baja) I	GARLICK et al.	1977	e	
Pilze				
Myxomycetes z. B.				
Physarum polycephalum	PEZET und PONT	1977		
Oomycetes z. B.				
Albugo candita	PEZET und PONT	1977		
Ascomycetes z. B.				
Botrytis cinerea	PEZET und PONT	1977		
Nectaria cinnabarina	PEZET und PONT	1977		
Basidiomycetes z. B.				
Puccinia graminis	PEZET und PONT	1977		
Pisolithus tinctorius	MUNCIE et al.	1975		
Fungi imperfecti z. B.				
Coniella diplodiella	PEZET und PONT	1977		
Phomopsis viticola	PEZET und PONT	1977		
Algen				
Rotalgen				
Ceramium rubrum	IKAWA et al.	1973		0,008% des TG
Erythrophyllum delesseriodes	IZAC et al.	1982		0,200% des TG
niedere Algen	NAKAMURA	1937		
Pflanzen				
Moose				
Tillandsia usneoides	WELD	1945		
Magnoliidae				
Ceratophyllum densum	WIUM-ANDERSEN et al.	1983		

Abkürzungen : e = extrazellulär ; i = intrazellulär ; i→e = Transport aus der Zelle ; TG = Trockengewicht ; S_α = orthorhombischer Schwefel ; S_μ = flüssiger Schwefel.

bindungen eine Rolle bei der Aufnahme spielen. Dies konnte schon für strukturähnliche Verbindungen, wie Asparaginsäure/Asparagin oder Glutaminsäure/Glutamin (BIRT und HIRD 1958), beobachtet werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist in der Existenz von zwei unterschiedlichen Aufnahmesystemen für Aminosäuren zu sehen, die unabhängig reguliert sein können.
Bevor man ein Modell der möglichen enzymatischen Reaktionswege (Schema C) vom Cysteinäthylester zum elementaren Schwefel entwickelt, ist es notwendig, die in diesem Zusammenhang relevanten rein chemischen Reaktionen, die vom und zum elementaren Schwefel (S^o) führen, kurz abzuhandeln, um sich über Artefaktreaktionen Klarheit zu verschaffen (Schema C).
Unter sauren Bedingungen laufen bevorzugt die Reaktionen C4 und C7 , im Alkalischen die Reaktionen C2, C3, C5, C8 und C9 ab. Die Reaktionen C11 und C2 wurden in dieser Arbeit zum Nachweis von elementaren Schwefel eingesetzt (2.2.8.2 bzw. 2.2.8.1; Tab. 29). Es konnten bei C2 bevorzugt Dithiole, wie DTE oder BAL, sowie Monothiole, wie GSH, Cystein und Mercaptoäthanol, verwendet werden (ABDOLRASULNIA und WOOD 1980). Bei C5 reagieren 10 % der eingesetzten Thiole, wie Mercaptoäthanol, Mercaptopyruvat oder Cystein, im Alkalischen zu Persulfiden, die im Sauren von C4 wieder zu S^o zerfallen.
Die Bildung der Polysulphane durch das S-nucleophile Sulfid (C6) hängt von der Menge des eingesetzten Sulfids ab.



Schema C:

Schema C : Chemische Reaktionen um elementaren Schwefel

1) H_2S + Cyt $c_{ox.}$ ⟶ S^o + Cyt $c_{red.}$ + 2 H^+; Oxidoreduktion von elementarem Schwefel oder Sulfid mit z.B. Cytochrom c (FISCHER und TRUPER 1977).

2) S^o + 2 RSH $\xrightarrow{pH > 7}$ H_2S + RSSR ; (KAJI und McELROY 1959). Das Testsystem dieser Arbeit (2.2.8.1; Tab. 29).

3) H_2S + RSSR $\xrightarrow{pH > 7}$ RSSH + RSH ; Oxidation zu Persulfiden (RAO und GORIN 1959).

4) RSSH $\xrightarrow{pH < 7}$ RSH + S^o; Spontaner Zerfall des Persulfids (RAO und GORIN 1959; FLAVIN 1962; CAVALLINI et al. 1960).

5) S^o + RSH $\xrightarrow{pH > 7}$ RSSH; Bildung von Persulfiden mit Thiolen (HYLIN und WOOD 1959).

6) S^o + n HS^- ⟶ HS_n^- ; Polysulphan-Bildung (DAVIS 1958).

7) 2 S^o + 2 CySH $\xrightarrow{pH < 7}$ CySSSCy + H_2S ; Bildung von Thiocystin (FLETCHER und ROBSON 1963).

8) Zerfall von Thiocystin unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Thiolen in einer mehrstufigen Reaktion (SZCZEPKOWSKI und WOOD 1967; ABDOLRASULNIA und WOOD 1980) :

CySSSCy + RSH ⟶ CySSH + RSSCy (a); CySSH ⟶ CySH + S^o (b);

CySH + RSSCy ⟶ CySSCy + RSH (c); Summengleichung : CySSSCy $\xrightarrow{pH\ 7-9}$ S^o + CySSCy (d).

9) S_8 + 8 OH^- ⟶ 2 $S_2O_3^{2-}$ + 4 HS^- + 2 H_2O ; Disproportionierung von S^o in Gegenwart von nucleophilen Hydroxylionen (PRYOR 1962).

10) a) Bildung von Thiosulfat S_8 + 8 SO_3^{2-} ⟶ 8 $S_2O_3^{2-}$; (FOSS 1950; SUZUKI 1965; SCHMIDT 1963, 1965)

Der erste nucleophile Angriff von Sulfit an den zyklischen S_8-Ring geschieht in einer langsamen Reaktion (a_1), wobei der Ring aufgespalten wird und das lineare Octosulfan-monosulfonat entsteht. Ein weiteres Sulfition kann nun an den nucleophilen Zentren angreifen. Dabei wird sehr schnell ein Thiosulfat (a_2) oder ein Sulfan-monosulfonat (a_3) verdrängt. Das Zentrum des Angriffs kann nicht unterschieden werden. Nach weiteren 6 nucleophilen Angriffen von Sulfit ist S_8 vollständig zu Thiosulfat umgesetzt.

S_8 + SO_3^{2-} ⟶ $^-S^1$-S^2-S^3-S^4-S^5-S^6-S^7-S^8-$S^9O_3^-$ Octosulfan-monosulfonat (a_1):

$^-S^1$-S^2-S^3-S^4-S^5-S^6-S^7-S^8-$S^9O_3^-$ ⟶ S^1-$S^2O_3^{2-}$ + $^-S^3$-S^4-S^5-S^6-S^7-S^8-$S^9O_3^-$ (a_2);

$^-S^1$-S^2-S^3-S^4-S^5-S^6-$S^7O_3^-$ + S^8-$S^9O_3^{2-}$ (a_3).

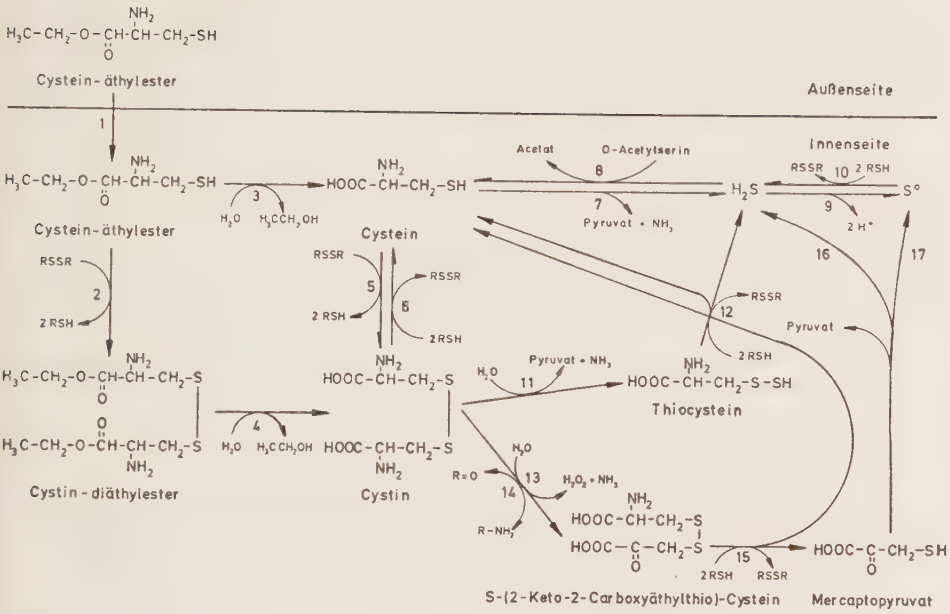
b) Disproportionierung von Thiosulfat im Sauren zu S^o und Sulfit

$S_2O_3^{2-}$ $\xrightarrow{pH < 4}$ S^o + SO_3^{2-} ; (KAJI und McELROY 1959), Zwischenprodukt soll ($H_2S_2O_3$) sein (HASHWA und PFENNIG 1972).

11) S_8 + 8 CN^- ⟶ 8 SCN^- ; Bildung von Thiocyanat durch einen nucleophilen Angriff von Cyanidionen in einer zu 10) analogen Reaktion. Bei diesem klassischen Schwefelnachweis (2.2.8.2; BARTLETT und SKOOG 1954; BARTLETT und DAVIS 1958) wird der Ring durch Cyanid erst langsam gespalten, um dann in einem weiteren Angriff an das nucleophile Zentrum das Thiocyanation rasch zu verdrängen (FOSS 1950).

Versucht man nun Reaktionsketten zu entwickeln, die die Bildung von elementarem Schwefel aus Cysteinäthylester erklären könnten, so sind die in Schema D dargestellten Enzymschritte denkbar. Bisher konnten aber nur einige Enzyme (D2, D5, D7, D8, D10, D16 und D17) auch aus Chlorella nachgewiesen werden. Die Reihenfolge der dabei zu Cystein und Cystin führenden Enzyme kann aufgrund der durchgeführten Untersuchungen nicht endgültig festgelegt werden.

Die unter 3.4.2.9 gemachten Beobachtungen, daß Cystindiäthylester zu noch höheren Mengen an gebundenem Sulfid als der reduzierte Ester führt, unterstützt die in Schema D beschriebenen Reaktionsfolgen, die aus einer Cysteinäthylpermease (D1), einer Cysteinoxidase (D2) und einer Carboxylesterase (D3) bestehen. Andererseits kann der im Medium vorliegende Cysteinäthylester sowohl autoxidativ wie auch mit der membrangebundenen Cysteinoxidase (D2) zuerst zu Cystindiäthylester umgesetzt werden, der mit einer Permease in die Zelle gelangt, um dort zu Cystin (D4) abgebaut zu werden. Extrazelluläre Carboxylesterasen (D3) sind bisher nicht beschrieben, so daß Cystein, als die von der Alge mittels Cysteinpermease aufgenommene Verbindung ausscheidet. Da die Algen unter aeroben Bedingungen angezogen werden und beim Wachstum auf Cysteinester erhöhte Cysteinoxidaseaktivität (KRÄMER 1983) besitzen, dürfte sich Cystein nie in großen Mengen anhäufen.
Andererseits wird Cystein beim Cystinmetabolismus (D12, D15) freigesetzt, so daß die vom und zum Cystein führenden Reaktionen durchaus zur Gleichgewichtssteuerung von Bedeutung sein können.
Nimmt man an, daß die Aufnahme des Cysteinäthylesters vor der Oxidation stattfindet, so sind dafür cysteinbindende und -transportierende Systeme, die sogenannten Permeasen (D1), nötig, welche auch aus Pflanzen isoliert werden konnten. Für Chlorella liegen bisher nur wenige Ergebnisse vor, die die Existenz einer Cysteinpermease beweisen. L-Cystein scheint mit einer relativ unspezifischen Argininpermease aufgenommen zu werden (SAUER et al. 1983). Ausführlichere Daten gibt es für Tabak, für den ein unspezifisches Aminosäuretransportprotein mit einem K_m von $3{,}5 \times 10^{-4}$ M und eine cysteinspezifische Permease mit einem K_m von $1{,}7 \times 10^{-5}$ M beschrieben ist, die Cystein als Zwitterion bei pH 4,5 verwenden (HARRINGTON und SMITH 1977).
Dabei tritt ein H^+-Cotransport auf. Es muß daher als wahrscheinlich angenommen werden, daß Cysteinäthylester über eine andere Permease in die Zelle gelangt, da diese Verbindung wegen der veresterten Carboxylgruppe nicht als Zwitterion auftritt und zudem eine geringe Hemmung der Cysteinpermease durch Cysteinäthylester bei Tabak (23 %) bekannt ist. Dieses Enzym wird nach einer Art feedback-Hemmung durch L-Cystein, seinem Substrat, gehemmt (86 % für Penicillum,



Schema D : Biochemische Reaktionen zum elementaren Schwefel

1) Cysteinaufnahme, Tabak (HARRINGTON und SMITH 1977); 2) Cysteinoxidase , Chlorella (KRÄMER und SCHMIDT 1984); 3) Carboxylesterase, verschiedene Pflanzen (SCHWARTZ et al. 1964); 4) Carboxylesterase. siehe 3); 5) Cysteinoxidase, siehe 2); 6) Cystinreduktase, Erbse (ROMANO und NICKERSON 1954; HATCH und TURNER 1960); 7) Cysteindesulfhydrase, Chlorella (SCHMIDT und ERDLE 1983) 8) Cysteinsynthase Chlorella (SCHMIDT 1977b); 9) a) Anoxygene Photosynthese, Blaualgen (GARLICK et al. 1977); b) Oxidation, durch Cytochrom, Chromatiaceae (FISCHER 1977); 10) Reduktion, Chlorella, Tab. 29; 11) Cystinlyase, Kohlrübe (MAZELIS et al. 1982); 12) Spaltung, Hinweise aus der Kohlrübe (ANDERSON und THOMPSON 1979); 13) Aminosäureoxidase, Escherichia coli (MEISTER et al. 1954); 14) Aminosäuretransaminase, indirekter Hinweis aus Ratten (UBUKA et al. 1983); 15) chemische Reduktion mit Thiolen, siehe 6); 16) Mercapto-pyruvatreduktase, Escherichia coli (KONDO et al. 1956); 17) Mercaptopyruvatsulfotransferase, Chlorella (SCHMIDT 1984).

SKYE und SEGEL 1970 ; 87 % für Escherichia coli LOMBARDI und KABACK 1972 ; Salmonella, BAPTIST und KREDICH 1977), wohingegen D-Cystein einen stärkeren Einfluß aufweist (35 % für Tabak, HARRINGTON und SMITH 1977). Auch die basischen Aminosäuren scheinen um Cysteinpermeasen zu konkurrieren, wie dies bei Tabak für Arginin (81 % Hemmung) und Lysin (76 % Hemmung) von HART und FILNER (1969) beschrieben wurde.

Das Aufteten einer konstitutiven, unspezifischen (I) und einer spezifischen (II) Aminosäurepermease ist auch für Bakterien (Salmonella, unspez. (I) K_m = 2×10^{-6} M, spez. (II) $K_m = 5 \times 10^{-8}$ M, BAPTIST und KREDICH 1977 ; Escherichia coli, $K_m = 3{,}8 \times 10^{-5}$ M, LOMBARDI und KABACK 1972) und Pilze (Penicillium, unspez. (I) $K_m = 3 \times 10^{-5}$ M, spez. (II) $K_m = 1{,}4 \times 10^{-4}$ M, SKYE und SEGEL 1970) beschrieben. Tierische Cysteinpermeasen besitzen einen niedrigen K_m von 0,6 mM (SEGAL und CRAWHALL 1968).

Wenn der Cysteinäthylester aber zuerst autoxidativ oder mit der Cysteinoxidase, die weiter unten näher betrachtet werden soll, zu Cystinäthylester umgesetzt wird, so muß dieser oxidierte Ester aufgenommen werden. Auch hier scheint es wenig wahrscheinlich, daß der Cysteindiäthylester mit einer unspezifischen Cystinpermease in die Zelle gebracht wird, da der oxidierte Ester nicht als Zwitterion auftritt und zudem die Cystinpermease bei Escherichia coli (53 %, BERGER und HEPPEL 1972) und bei Salmonella durch Cystin praktisch nicht gehemmt wird (BAPTIST und KREDICH 1977).

Pflanzliche Cystinpermeasen wurden bisher nicht untersucht. Bei Bakterien werden auch zwei, eine unspezifische (I) und eine spezifische (II) Cystinpermease beobachtet. Bei Escherichia coli liegen die K_m-Werte für (I) bei 2×10^{-8} M und für (II) bei 3×10^{-7} M (BERGER und HEPPEL 1972) und bei Salmonella typhimurium für (I) bei 2×10^{-6} M und für (II) bei 5×10^{-8} M. Bei Penicillium findet sich nur ein K_m-Wert von 3×10^{-5} M für die Cystinpermease, die durch Schwefelmangel stimuliert werden kann (SKYE und SEGEL 1970) und bei der Ratte eine mit einem K_m-Wert von 0,6 mM (SEGAL und CRAWHALL 1968).

Die Oxidation des Cysteinäthylesters könnte, wie beim Cystein beobachtet, zu mehreren Reaktionsprodukten führen. Unter den Wachstumsbedingungen kann eine Autoxidation (D2) von Cystein bzw. Cysteinäthylester zu Cystin bzw. Cystindiäthylester erfolgen, wobei Schwermetallionen die Reaktion katalysieren, wie dies unter 3.3.1.6 ausführlicher dargestellt ist. Aus tierischen und pflanzlichen Systemen sind Cysteindioxygenasen (EC 1.13.11.20) bekannt, die Ester zu Cysteinsulfinsäuren umsetzen. L- bzw. D-Aminosäureoxidasen (EC 1.4.3.2 bzw. 1.4.3.3) desaminieren oxidativ Cystein zu Mercaptopyruvat (Schema D).

Aus Pflanzen wurden bisher nur Cysteinoxidasen (D2, D5) beschrieben, die Cystein mit Sauerstoff zu Cystin oxidieren, wie sie aus Chlorella (KRÄMER und SCHMIDT 1983), Synechococcus, Spinat und Rhodopseudomonas beschrieben sind (KRÄMER 1983). Diese Organismen können Cysteinäthylester noch erheblich besser (bis 5-fach) als Cystein oxidieren, wobei die Cysteinoxidase beim Wachstum auf Cysteinäthylester induziert wurde (SCHMIDT und KRÄMER 1983).

Zudem scheint der Cysteinäthylester auch die Oxidation von Cystein zu erhöhen (KRÄMER 1983). Dieses Enzym zeigt noch eine gewisse Aktivität mit Cysteamin und Homocystein. Der K_m beträgt für Cystein bei Chlorella 3,3 mM. Die einzige, bisher beschriebene nicht pflanzliche Cysteinoxidase wurde bei Neisseria gefunden. Ihr K_m-Wert beträgt 1,4 x 10^{-2} M und liegt im Rahmen der K_m-Daten tierischer Aminosäureoxidasen (YU und DeVOE 1981).

Die unspezifische Cysteamindioxygenase setzt ebenfalls Cysteinäthylester zu Cystindiäthylester um. Nur in Gegenwart von Elektronendonatoren kann die Oxidation zur entsprechenden Säure weitergehen (Pferdenieren, CAVALLINI et al. 1971). Cystein- bzw. Cystinester können anschließend mit Carboxylesterasen (EC 3.1.1 ; D3) zu Cystein bzw. Cystin umgesetzt werden. Dies wurde bisher für Weizen, Sojabohne, Mais (JOOSTE und MORELAND 1963), Zitrus- und Kürbispflanzen (SCHWARTZ et al. 1964) gezeigt.

Sollte der Cysteinäthylester sofort nach Eintritt in die Zelle mit der Carboxylesterase (D3, D4) zu Cystein umgesetzt worden sein, so wird auch Cystein mit der gerade besprochenen Cysteinoxidase (D5) zu Cystin umgesetzt. Da die Substrataffinität der Cysteinoxidase um einiges höher als die der Carboxylesterase ist, dürfte nur wenig Cystein durch die Carboxylesterase entstanden sein.

Da die Chlorellazelle Cystein zum Einbau in Protein unter normalen Wachstumsbedingungen, die bei der Sulfatkultur vorherrschen dürften, benötigt, wird sie das auf dem Weg D1 und D3 gebildete Cystein dem Gleichgewicht entziehen. Zudem besteht die Möglichkeit, das auf den alternativen Wegen D1, D2 und D3 oder D1, D3 und D5 entstandene Cystein einer unter aeroben Verhältnissen stabilen S-Verbindung, durch eine Cystinreduktase (EC 1.6.4.1) zu Cystein umzuwandeln. Durch den ständigen Verbrauch von Cystein bei Proteinbiosynthesen stellt sich ein Gleichgewicht von Cystin und Cystein ein. Bisher wurde als Coenzym der Cystinreduktase für Pflanzen bei Erbsen reduziertes Glutathion (HATCH und TURNER 1960b) oder $NADH/H^+$ (ROMANO und NICKERSON 1954) und bei Pilzen $NADPH/H^+$ für Hefe (ROMANO und NICKERSON 1954) und bei Tieren $NADH/H^+$ (TIETZE et al. 1972) oder Thioredoxin selbst (HOLMGREEN 1979) beschrieben. Untersuchungen unseres Labors mit Chlorella deuten auf Thioredoxin als Coenzym der Cystinreduktase hin, doch stehen eindeutige Ergebnisse noch aus.

Würde die Aufnahme und der Metabolismus der Cystein- und Cystinester nur zur Bereitstellung von Cystein für Proteinbiosynthesen führen, wären ihr Metabolismus weitgehend bekannt. Wie aber aus Abb. 33 hervorgeht, häuft sich elementarer Schwefel nur in der logarithmischen Wachstumsphase von Chlorella an, um in

der stationären Phase wieder remobilisiert zu werden. Elementarer Schwefel stellt somit einen Schwefelspeicher für reduzierte Schwefelverbindungen bei Chlorella dar, da die Zelle wegen der besonders raschen Aufnahme und Metabolisierung der Cystein- und Cystinester mit Cystein und Cystin überschwemmt wird. Die Zellen müssen somit über Enzyme verfügen, die elementaren Schwefel bilden und wieder zu Cystein reaktivieren können.

Cystein könnte mit der L-Cysteindesulfhydrase (EC 4.4.1.1) zu Schwefelwasserstoff, Pyruvat und Ammoniak abgebaut werden. Diese Aktivität scheint bei Chlorella nur eine Artefaktreaktion der Cysteinsynthase (EC 4.2.99.8) zu sein. Die Problematik dieses Themenkomplexes wird unter 3.7.5.2 ausführlicher abgehandelt. Der gebildete Schwefelwasserstoff könnte mit einer aus Chlorobium bekannten Cytochrom c -Oxidase zu elementarem Schwefel umgesetzt werden (FISCHER und TRÜPER 1977). Da KREUZBERG (1982) ein Wachstum von Chlorella unter anaeroben Bedingungen erzielen konnte, ist das Vorkommen einer anoxigenen Photosynthese, wie sie aus Blaualgen (GARLICK et al. 1977) bekannt ist, denkbar. Schwefelwasserstoff kann auch im Dunkeln unter Sauerstoffausschluß zu elementarem Schwefel vergoren werden, wie dies SHILO et al. (1979) bzw. OREN und SHILO (1979) für Oscillatoria beobachteten. Zudem ist eine Schwefelwasserstoffoxidation, wie wir sie von phototropen Bakterien kennen (VAN GEMERDEN 1981),möglich.

Obwohl die Bildung von elementarem Schwefel mit Enzymen von Pflanzen und phototropen Bakterien aus Cystein bekannt ist, scheint Cystin wegen der großen Oxidaseaktivitäten, die durch Cysteinäthylester als Schwefelquelle noch gesteigert worden sind, das Ausgangsprodukt zur Schwefelbildung zu sein. Aus den in Schema D dargestellten Reaktionen sollen nur die zwei wichtigsten hervorgehoben werden. Die von Cruziferen wie Weißkohl, Blumenkohl, Senf, Steckrübe und gelbe Kohlrübe, bekannte Cystinlyase (EC 4.2.1.15) setzt Cystin zu Thiocystein um, welches aber bisher nicht direkt nachgewiesen werden konnte. Der K_m-Wert beträgt für Cystin bei Weißkohl 0,3 mM (HALL und SMITH 1983), bei der gelben Kohlrübe 1,0 mM (MAZELIS et al. 1967) und bei der Steckrübe 1,3 mM (MAZELIS et al. 1982) bzw. 0,94 mM (ANDERSON und THOMPSON 1979). Als Coenzym tritt Pyridoxalphosphat auf, dessen K_m für die gelbe Kohlrübe 0,5 µM (MAZELIS et al. 1967) beträgt. Es gelang bisher aber nicht, dieses Enzym bei Rettich Astragalus, Petersilie, Gerste, Zwiebel (MAZELIS et al. 1967) und Chlorella (APPELTAUER 1984) nachzuweisen.

Das entstandene Thiocystein zerfällt in einer chemischen Reaktion zu Cystein und elementaren Schwefel (SZCZEPKOWSKI und WOOD 1967) bzw. zu Schwefelwasser-

stoff (ANDERSON und THOMPSON 1979).
Da die Cystinlyase, das Startenzym dieses Abbauweges bisher nur für Cruziferen bekannt ist, scheint der zweite Weg wahrscheinlicher zu sein, wenngleich fast nur tierische und bakterielle Systeme die vorgestellten Enzyme bisher aufweisen. Cystin kann mit einer L-Aminosäureoxidase (EC 1.4.3.2) zu S-(2-Keto-2-Carboxyäthylthio)-Cystein oxidativ desaminiert werden, wie dies aus Proteus vulgaris (CHEN et al. 1971) oder Schlangenserum (UBUKA und YAO 1973, CHEN et al. 1971) bekannt ist. Für Schlangenserum ist ein K_m von 0,5 mM für Cystin beobachtet worden.
Eine alternative Reaktion stellt eine Aminosäuretransaminase dar, die Cystin zu S-(2-Keto-2-Carboxyäthylthio)-Cystein umsetzen kann, wobei Pyridoxalphosphat die Reaktion beschleunigt. Auf die Existenz einer Cystin-Aminosäuretransaminase kann nur indirekt geschlossen werden, da das instabile S-(2-Keto-2-Carboxyäthylthio)-Cystein unter aeroben Bedingungen zu S-(2-Hydroxy-2-Carboxyäthylthio)-Cystein weiterreagiert und als solches nachgewiesen wurde (KOBAYASHI 1970).
Ob die Transaminierung durch eine Cysteintransaminase prinzipiell unmöglich ist, bleibt offen, da nur zwei Forschergruppen bei der Rattenleber (UBUKA et al. 1978) und der Bohne (FOREST und WIGHTMAN 1972) die Spezifität dieses Enzyms angeben. Die Autoren konnten keine Cystintransaminase mit Pyruvat oder α-Ketoglutamat beobachten, was im Widerspruch zu den Ergebnissen von KOBAYASHI (1970) steht. Bei Blumenkohl konnte bisher keine Cystein-, nur eine Cysteinsäure- und Cysteinsulfinsäuretransaminase (ELLIS und DAVIES 1961) beobachtet werden, die durch Cystein, Glutathion, Homocystein und Thioglycolat gehemmt wird.
In Gegenwart von Thiolen wird das S-(2-Keto-2-Carboxyäthylthio)-Cystein spontan zu Cystein und Mercaptopyruvat gespalten. Während das Cystein für Proteinsynthesen benötigt wird, kann das Mercaptopyruvat mittels einer Mercaptopyruvatsulfurtransferase (EC 2.8.1.2) zu Pyruvat und elementaren Schwefel umgesetzt werden, wie dies für Chlorella (SCHMIDT 1984) und Escherichia coli von KONDO et al. (1956) und VACHEK und WOOD (1972) beobachtet wurde. Der K_m beträgt für Mercaptopyruvat bei Chlorella 2 mM . Das Enzym zeigt auch mit Mercaptoäthanol, GSH oder Sulfit gute Umsätze. Auch Ratten enthalten Mercaptopyruvatsulfurtransferasen, die aber bei der "Desulfurikation" den Schwefel in Form von Polysulfiden freisetzen (HYLIN und WOOD 1959). Andererseits kann auch ein Schwefeltransfer zu Schwefelakzeptoren beobachtet werden, so daß Schwefelwasserstoff bzw. Thiocyanat oder Thiosulfat in Gegenwart von Cyanid oder Sulfit entstehen kann (MEISTER et al. 1954, FANSHIER und KUN 1962). Das Enzym enthält ein Kupfer- und ein Zinkatom.

Elementarer Schwefel, ganz gleich ob in orthorhombischer oder flüssiger Form oder gar als Polysulfid, stellt einen Schwefelspeicher beim Überschwemmen der Zelle mit reduzierten Schwefelverbindungen dar. Sein Abbau in der stationären Phase kann nur durch Reduktion mit reduzierten Thiolen zu Schwefelwasserstoff eingeleitet werden. Diese chemische Reaktion wird in Tab. 29 ausführlich dargestellt. Die Speicherung von elementarem Schwefel hängt somit vom Gleichgewicht von reduzierten und oxidierten Thiolen ab. Der gebildete Schwefelwasserstoff kann mit der in dieser Arbeit sehr ausführlich untersuchten Cysteinsynthase (3.7.2) zu Cystein refixiert werden. Ein weiteres Regulationsmodell der Steuerung der Bildung von elementarem Schwefel könnte die Kompartimentierung von elementarem Schwefel darstellen, der in einer Membraninvagination (PUCHKOVA et al. 1975) oder der Vakuole zu finden ist. Auch Cystein findet sich bei Tabak in der Vakuole gespeichert (SMITH 1981). Abschließend sei aber noch erwähnt, daß der eingesetzte Cysteinäthylester aber auch direkt mit D14 transaminiert werden könnte, wobei elementarer Schwefel über die Mercaptopyruvatsulfotransferase entstehen sollte.

Elementarer Schwefel scheint nicht nur ein Schwefelspeicher zu sein, sondern auch in viele Reaktionen einzugreifen. S^o stimuliert die Malatdehydrogenase aus Rinderherz (AGRO et al. 1976), während die Adenylatkinase aus Kaninchenmuskel gehemmt wird (CONNER und RUSSEL 1983). Zudem wird elementarer Schwefel von Pflanzen als bakteriostatische,fungizide und allelopatische Verbindung eingesetzt. So schützt S^o die Wasserpflanze Ceratophyllum vom Bewuchs mit Blaualgen (WIUM-ANDERSON et al. 1983), die Rotalge Ceramium vor Bacillus subtilis- Befall (IKAWA et al. 1973) und das Moos Tillandsia usneosides allgemein vor Bakterienbefall (WELD 1945). Die antibakterielle Wirkung gegen hämolytische Streptokoccen und Pneumokoccen beruht auf der Inaktivierung der zellwandgebundenen Enzyme durch Oxidation der Thiolgruppen dieser Enzyme (LIBENSON et al. 1953). Zudem kann S^o die Sporulation des Pilzes Phomopsis viticola (PEZET und PONT 1975) hemmen. Diese Eigenschaft von S^o wird im heutigen Weinbau genützt.

Es muß trotz allem offen bleiben, welche der beschriebenen Enzyme zur Bildung von S^o führen und welche Funktionen elementarer Schwefel dann innehat.

Es sei noch erwähnt, daß auch bei Catharanthus (5 nmol/mg Protein) ein "gebundenes Sulfid" gefunden wurde, das über die Freisetzung von Schwefelwasserstoff erkannt wurde (URLAUB und JANKOWSKI 1982). Hohe H_2S-Nullwerte treten auch bei Hibiscus und Spinat auf (KERNER 1983). Die hohen Thiosulfatreduktase-Nullwerte (20 nmol/mg Chlorophyll), die bei Chlorella beschrieben wurden (GAMON 1983),

treten bei der Dialyse in die Waschlösung und laufen nach dem Lyophilisieren durch einen PM-10-Filter. Da mit DTE keine Schwefelwasserstoffreisetzung erfolgte, kann diese Fraktion kein Thiosulfat sein. Somit bleiben die Strukturen der gerade beschriebenen "gebundenen Sulfide" weiterhin ungeklärt.
Der Nachweis von elementarem Schwefel aus Aniszellkulturen (2.1.2), die wie Chlorella auf L-Cysteinäthylester (3×10^{-4}M)/Sulfat (2×10^{-4}M) wuchsen, gelang weder aus undifferenzierten Zellen wie auch aus Embryonen nicht.

3.6 Vorkommen, Nachweis und Eigenschaften von Gaitonde-positiven Verbindungen

Bei den Regulationsversuchen der Cysteinsynthase (3.4 ; Tab. 31) traten unter gewissen Wachstumsbedingungen erhöhte Nullwerte auf, die das typische Gaitonde-Spektrum (Abb. 2) zeigen. Dies ist umso überraschender, als bisher keine Verbindungen außer Cystein bekannt waren, die in vivo gebildet wurden und das Cystein-typische Spektrum im sauren Ninhydrinnachweis (2.2.3.2) aufwiesen. Die unter 3.3.1.2.1 genannten Verbindungen, die ebenfalls positive Reaktionen mit diesem Nachweisreagenz liefern, wurden bisher mit Ausnahme von S-Sulfocystein nicht in Organismen gefunden. Es war daher das Ziel der folgenden Untersuchungen, diese Gaitonde-positiven Verbindungen näher zu charakterisieren.

Tab. 31 : Erhöhte Nullwerte der Cysteinsynthase bei Chlorella

Schwefelquellen	" Cysteingehalt "	
	nmol / mg Protein	nmol / mg Chlorophyll
Sulfat	1,3*	11,4
Sulfat + OAS	6,2	93,3
Sulfat + L-CÄE	7,3	95,0
Sulfat + L-CÄE + OAS	81,7	1010,0
Sulfat + L-CÄE + NAS	11,9	100,0
Sulfat + L-CÄE + L-Serin	4,4	79,0

Die Chlorellazellen wuchsen unter Stanardbedingungen(3.4.2) auf folgenden Medien, wobei Sulfat stets zu 0,2 mM und die anderen Verbindungen zu 0,3 mM eingesetzt wurden. Die Nullwerte des Cysteinsynthasetestes (2.5.1) wurden mit Chlorella-Rohextrakten ermittelt.
* = kein Cysteinspektrum beim Nachweis (2.2.3.2).

3.6.1 Eigenschaften der Gaitonde-positiven Verbindungen

In Tab. 32 sind die Eigenschaften aller Verbindungen zusammengefaßt, die bei chemischen Synthesen aber,auch in vitro und in vivo auftreten und als "Cystein" bestimmt werden. Zu Vergleichszwecken unterwarf man chemisch reine und selbst

synthetisierte Verbindungen (2.8.3) den gleichen Trenn- und Nachweisverfahren.

Die in Tab. 32 als Cystein identifizierte Fraktion wurde durch identisches Verhalten mit authentischem Cystein in beiden Trennsäulen und auch mit dem Gaitonde-Reagenz , besonders in Gegenwart von DTE, nachgewiesen. Auch das Cystein-spezifische Maximum von 460 nm (Abb. 4) im neutralen Ninhydrinnachweis (2.2.3.1) bestätigt dies. Zudem kann diese Fraktion mit Cysteindesulfhydrasen zu Schwefelwasserstoff umgesetzt werden (2.5.3).
Die als DTE identifizierte Fraktion kann wie authentisches DTE mit DTNB nachgewiesen werden und tritt nur in Reaktionsansätzen auf, die bereits DTE enthielten.

Tab. 32 : Eigenschaften der Gaitonde-positiven Verbindungen

Verbindung	Trennverfahren			Nachweisverfahren					
	Trisacryl GF05		Dowex	G -	G +	NH	DTNB	UV	K
	V (ml)	Fr.	V (ml)						
Vergleichssubstanzen									
L-Cystein	98 ml	39	89 ml	(+)	+	+	+	+	-
DTE	117 ml	47	f	-	-	-	+	+	-
Pyruvat	63 ml	25	f	-	-	-	-	+	+
Glyoxylsäure	197 ml	79	f	-	-	-	-	+[1]	-
Thiazolidin-4-carbonsäure	55 ml	22	NH_4OH	(+)*	-	(+)*	-	+[2]	-
Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure	55 ml	22	43 ml (73 ml)	+	+	(+)*	-	+	+
Fraktion									
P-1	44 ml	18	NH_4OH	+	+	(+)	(+)	+	-
P-2	55 ml	22	43 ml	+	+	(+)	-	+	-
P-3	69 ml	28	f	+	+	+	+	+	-
Cystein	98 ml	39	89 ml	(+)	+	+	+	+	-
P-4	103 ml	41	f	+	-	+	+	+	-
$DTE_{red.}$	117 ml	47	f	-	-	-	+	+	-
P-5	128 ml	51	f	-	-	-	+	+	-
P-6	134 ml	54	f	-	-	f	+	+	-

Die Auftrennung geschah an einer Trisacryl GF05-Säule nach 2.3.3 oder einer Dowex 50WX8-Säule nach 2.3.4 , wobei die Trennung mit Wasser und anschließend Ammoniumhydroxid (NH_4OH-Fraktion) oder einem kontinuierlichen Gradienten von 0 - 1 M Ammoniumhydroxid geschah. Es werden die Elutionsvolumina der Spitzenfraktion angegeben. Der Nachweis erfolgte mit dem sauren Ninhydrinreagenz (2.2.3.2) ohne (G -) oder mit (G +) 2 mM DTE ; mit dem neutralen Ninhydrinreagenz (2.2.3.1 ; NH bei 460 nm (Abb. 4)) oder über die Thiolbestimmung (2.2.4 ; DTNB). Die Hydrolyse erfolgte nach Tab. 7 .

f = Angaben fehlen ( ) = schwache Reaktion ( )* = orange-gelbes Reaktionsprodukt (Abb. 14)
K = Ketogruppennachweis (2.2.10) UV = Spektralanalyse, Absorption bei 260 nm
UV^1 = Maximum bei 213 nm UV^2 = Maximum bei 223 nm

Die chemische Sruktur der Gaitonde-positiven Fraktionen konnte bisher nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden. Bei P-2 könnte es sich um ein Thiazolidinderivat handeln, da diese Fraktion gleiches Elutionsverhalten wie Thiazolidin-4-carbonsäure und Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure aufweist und ebenfalls auch ohne DTE Gaitonde-positiv ist. Diese Verbindung wandert in der Dünnschichtelektrophorese (2.3.2) im Gegensatz zu S-Sulfocystein nicht zur Anode sondern zur Kathode, womit S-Sulfocystein trotz gleichen Elutionsverhaltens auf der Trisacryl GF05-Säule (Tab. 3 ; 55 ml) ausscheidet.
Die chemische Struktur von P-1 liegt noch im Dunkeln. Es zeigt aber ein der Fraktion P-2 ähnliches Verhalten. Die für die Fraktion P-4 beobachteten Eigenschaften lassen eher auf eine Gaitonde-positive Verunreinigung schließen, da sie mit dem sauren Ninhydrinreagenz ohne DTE, nicht aber mit DTE, und mit dem neutralen Ninhydrinnachweis positive Ergebnisse liefert. Über ihre Struktur kann unter 2.6.3 ebenso wie über P-5 und P-6 nur spekuliert werden, wobei die letzteren beiden nur mit DTNB reagieren.

3.6.2 Vorkommen der Gaitonde-positiven Verbindungen

3.6.2.1 Chemische Reaktionsprodukte

Von den in Tab. 32 genannten Vergleichsverbindungen wurden einige selbst synthetisiert . In Tab. 32 sind die Auftrennungsergebnisse angeführt. Bei der Reaktion von L-Cystein mit DTE unter den gleichen Bedingungen wie die der Cysteinsynthasen von Tab. 33 wird Cystein, DTE und ein neues Produkt P-4 gefunden.
Die Synthese von Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure aus L-Cystein und Glyoxylsäure ergab neben dem nicht umgesetzten Cystein die Fraktion P-2, bei der es sich , wie der Vergleich mit Thiazolidin-4-carbonsäure zeigt, um die synthetisierte Verbindung handeln muß.

3.6.2.2 In vitro Reaktionsprodukte

Die beiden interessanten Fraktionen P-1 und P-2 traten stets bei der Reaktion von Cysteindesulfhydrasen mit Cystein auf und können somit relativ einfach hergestellt werden. Vergleicht man das Verhältnis von P-1 / P-2 / Cystein so beträgt es bei der L-Cysteindesulfhydrase ohne DTE 1 / 3 / 26, mit DTE 1 / 2 / 350, während es bei der D-Cysteindesulfhydrase ohne DTE 2 / 1 / 17, mit DTE 5 / 1 / 40 liegt. Erwähnt sei noch, daß P-2 bei letzterem Enzym oft nicht zweifelsfrei ermittelt werden konnte. Sein Gehalt ist durch DTE steuerbar, so daß er bei 5-fachem Überschuß von DTE gegenüber D-Cystein bis zu 8,2 % von P-1 betragen kann.

Tab. 33 : Vorkommen der Gaitonde-positiven Verbindungen

In vivo Versuche : Wachstum auf								
+ L-Cysteinäthylester	-		+	+			-	+
	+	+		(+)		-	-	-
	(+)	(+)		+	-	-	-	-
	(+)	(+)		(+)				-
: 24 Std	(+)	+		+	-	-	-	-
	+	+		(+)				-
(0,3 mM : 24 Std.)		+		+	-	-	-	-
D-Cystein (0,3 mM	+	+		(+)		-	-	-
D-Cystein (0,3 mM	+	+		+				
		+		+			-	
		+		+			-	-

Die [illegible] beschriebenen Verbindungen traten unter folgenden Bedingungen auf :

Chemische Synthesen

Cystein-DTE-Addukt : Synthese nach 2.8.3.2 ; Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure : Synthese nach 2.8.3.1.

In vitro Versuche

L-Cysteindesulfhydrase : Der Reaktionsansatz enthielt in 20 ml Endvolumen 50 mM Tris freie Base bei (-DTE) bzw. Tris-HCl pH 9,0 bei (+DTE); 2 mM L-Cystein; 2 mM DTE wo angegeben und die L-Cysteindesulfhydrase aus Chlorella, die aus einer Standard-Sulfatkultur (2.1.1.1) bis zur DEAE-Sephacel-Säule (2.6.1 - 2.6.3) aufgereinigt worden war. Die spezifische Aktivität betrug 3,67 µmol/mg Prot./h Sulfid für L-Cystein und kein Sulfid für D-Cystein. Die Inkubation erfolgte für 30 min. bei 37°C. Die weitere Aufarbeitung geschah nach 2.5.3.1 und 2.2.5.

D-Cysteindesulfhydrase : Der Reaktionsansatz enthielt in einem Endvolumen von 20 ml 50 mM Tris-HCl pH 9,0; 2 mM D-Cystein; 2 mM DTE wo angegeben und eine D-Cysteindesulfhydrase aus Spinat, die nach SCHMIDT (1977a) gereinigt worden war. Ihre spezifische Aktivität betrug kein Sulfid für L-Cystein [illegible] µmol mg Prot./h Sulfid für D-Cystein. Die Inkubation und Aufarbeitung erfolgte wie bei der L-Cysteindesulfhydrase.

[illegible] mit O-Acetyl-L-Serin : [illegible] Reaktionsansatz enthielt in 20 ml Endvolumen 50 mM Tris-HCl pH 7,5; [illegible] mM O-Acetyl-L-Serin; 10 mM DTE und die zuvor beschriebene L-Cysteindesulfhydrase. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 Stunde. Die Aufarbeitung erfolgt wie zuvor beschrieben.

Tab. 33 : Fortsetzung

In vivo Versuche :

Chlorella : Die Algen wuchsen unter Standardbedingungen (2.1.1.2) auf einem Schwefelmangelmedium, dem L-Cysteinathylester (0,3 mM) und O-Acetyl-L-Serin (OAS) (0,3 mM) zugesetzt worden waren. Die Extraktion und Aufreinigung der cysteinhaltigen Fraktion erfolgte wie unter 2.4.3 beschrieben. Die Zellzahl betrug 2,5 x 10^6, die $O.D._{680\ nm}$ 0,69 und das Gesamtprotein 29 mg. Die Gesamtcysteinmenge des Rohextraktes, bestimmt als Nullwert der Cysteinsynthase (2.5.1), ergab 1 µmol " Cystein ".

Spinat : Aus Spinatblättern wurden kleine Kreise (Ø = 1,7 cm) ausgestanzt. Je 20 Kreise wurden 18 Std. bei 28°C und 14 000 Lux in 40 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 oder 5 mM L-Cystein, gelöst im gleichen Puffer, inkubiert. Anschließend wurden die Blattausschnitte mit Wasser gespült, mit Wasser im Morser zerrieben und nach 2.4.3 extrahiert und aufgereinigt.

Lemna : Alle Kulturen wuchsen auf dem unter 2.1.3 beschriebenen Medium, dem die genannten Verbindungen in der angegebenen Konzentration zugesetzt worden waren. Die Glieder wurden in einem thiolfreien Aufbrechpuffer (2.1.1.2) mit dem Ultraturrax aufgeschlossen und nach 2.4.3 extrahiert. Die wässrige Phase reinigte man über eine Dowex 50WX8 oder eine Trisacryl GF05-Säule.

f = Daten fehlen ( ) = schwache Nachweisreaktion

L-Cysteindesulfhydrase bildet somit bevorzugt P-2, während die D-Cysteindesulfhydrase nur Spuren von P-2 aber größere Mengen an P-1 als Reaktionsprodukte hat.
Zudem tritt aber neben Cystein und DTE auch die Fraktion P-4 auf, die schon bei der chemischen Reaktion von Cystein mit DTE gefunden wurde. P-6 wird nur in Ansätzen der L-Cysteindesulfhydrase mit DTE und L-Cystein bzw. O-Acetyl-L-Serin beobachtet, während P-5 nur bei der D-Cysteindesulfhydrase mit DTE auftritt.

3.6.2.3 In vivo Reaktionsprodukte

Gaitonde-positive Verbindungen konnten bei einigen Organismen unter gewissen Wachstumsbedingungen gefunden werden, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen (Tab. 33).
Bei der Blaualge Synechococcus 6301 wurden während der Regulationsversuche wiederholt erhöhte Cysteinsynthase-Nullwerte (2.5.1) beobachtet, die auf eine Bildung von Cystein und Cysteinderivaten hinwiesen. Erhöhte Nullwerte traten z.B. beim Wachstum auf L-Methioninsulfon, Sulfoessigsäure, Mercaptoessigsäure, reduziertes Glutathion, L-Homocystin und L-Cystein auf. Sie wurden aber nicht weiter untersucht. Bei 4-tägigem Wachstum auf D-Cystin (0,2 mM) wurde ein Gehalt aller Gaitonde-positiven Verbindungen im Nullwert von 42,2 nmol/mg Protein bzw. 3349 nmol/mg Chlorophyll ermittelt. Es muß sich dabei hauptsächlich um oxidierte Verbindungen wie D/L-Cystin handeln, da erst DTE-Zusatz einen positiven Gaitonde-Test ergab.
Bei der Grünalge Chlorella fusca wurden unter Standardbedingungen beim Wachstum auf Cysteinestern mit und ohne Sulfatzusatz sowie besonders auf L-Cysteinäthyl-

ester (0,3 mM) / O-Acetyl-L-Serin (0,3 mM) / Sulfat (0,2 mM) erhöhte Nullwerte der Cysteinsynthase beobachtet. Wie aus Tab. 31 hervorgeht, scheint O-Acetyl-L-serin den Nullwert erheblich zu steigern. Nach Extraktion und Auftrennung fand man für diese Bedingungen die Fraktionen P-1, P-2 und Cystein. Bei der Inkubation von Spinatblattscheiben in L-Cystein (5 mM) können ebenfalls nach Extraktion und Aufreinigung die Fraktionen P-1 und P-2 im Verhältnis 1/4 gefunden werden, während ein Kontrollansatz im Phosphatpuffer allein nur Spuren dieser Verbindung aufweist.

Bei Lemna führt der Zusatz von reduziertem Glutathion (0,3 mM, 12 h) / Thiosulfat (0,3 mM, 24 h), L-Cysteinmethylester / Sulfat (0,3 / 0,2 mM, 24 h), L-Cysteinäthylester (1,0 mM, 24 h) und L-Cysteinäthylester / Sulfat (0,3 / 0,2 mM, 24 h) zu hohen Cysteinsynthase-Nullwerten.

Auch L- und D-Cystein erhöhen diesen Wert, der bei L-Cystein (0,3 mM, 28 h) 607 nmol/mg Protein und bei D-Cystein (0,3 mM, 28 h) 767 nmol/mg Protein beträgt. Nach Extraktion und Aufreinigung finden sich beim Wachstum auf Sulfatmedium nur geringe Spuren von P-1 und P-2. Der Zusatz von L- oder D-Cystein läßt stets die Fraktion P-2 entstehen, während P-1 nur nach 24 Stunden, nicht aber nach 28 Stunden, und dann nur in geringen Mengen, zu finden ist. Auch Lemna bildet mit L-Cysteinäthylester (1 mM, 24 h) P-2 wie Chlorella.

Besonders interessant ist es, die Cysteinfraktion auf ihre Stereospezifität hin zu untersuchen. Dabei betrug das Verhältnis von L- zu D-Cystein beim Wachstum auf L-Cystein (1 mM, 24 h) 1 / 2 und bei D-Cystein (1mM, 24 h) 1 / 3. Die Messungen wurden mit den in der Tab. 34 genannten Cysteindesulfhydrasen durchgeführt und wiesen gewisse Schwankungen auf. Diese Ergebnisse deuten auf Cysteinracemasen hin, die bisher noch nicht bekannt waren. Lemnakulturen sind somit besonders gut zum Studium der Fraktionen P-1 und P-2 sowie von Racemasen geeignet.

3.6.3 Diskussion

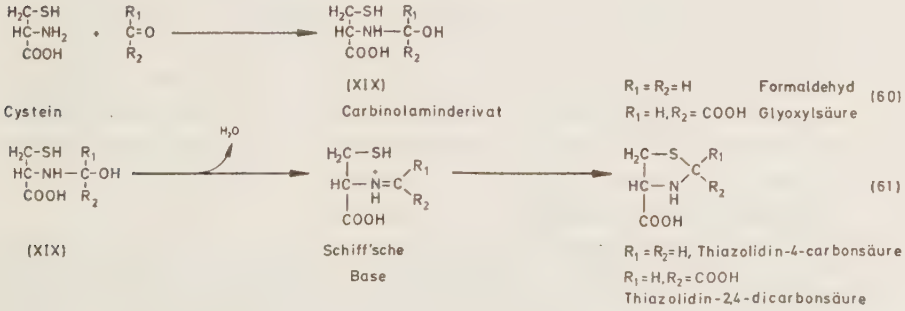
Ein wichtiges Ergebnis dieses Kapitels ist das in vivo Vorkommen von Substanzen, die im sauren Ninhydrinnachweis positive Reaktionen ergeben, wie sie in vivo nur von Cystein bekannt sind. Obwohl man schon seit einiger Zeit weiß, daß einige Verbindungen (3.3.1.2.1) ebenfalls mit dem Reagenz nachgewiesen werden können, erschien dies nicht von großem Interesse zu sein, da diese Verbindungen bisher (noch) nicht in vivo gefunden werden konnten. Die Unspezifität des Gaitonde-Nachweises läßt Zweifel an Versuchen aufkommen, die

Cystein ohne Vortrennung mittels Dünnschicht- oder Säulenchromatographie mit diesem Reagenz bestimmt haben. Die bisher so geschätzte Spezifität des Gaitonde-Reagenzes gegenüber den sonst üblichen Verfahren (3.3.1.6) muß stark eingeschränkt werden.

Aus diesen Gründen war es besonders interessant, die Struktur der in vivo gebildeten Verbindungen P-1, P-2, P-3, P-4, P-5 und P-6 zu kennen. Dies gelang bisher aber nicht vollständig und ist in weiterer Bearbeitung.

Um die im Folgenden genannten Strukturvorschläge absichern zu können, synthetisierte man in vitro unter bekannten Bedingungen Vergleichssubstanzen, deren Eigenschaften aber in der Literatur nur unzureichend beschrieben wurden.

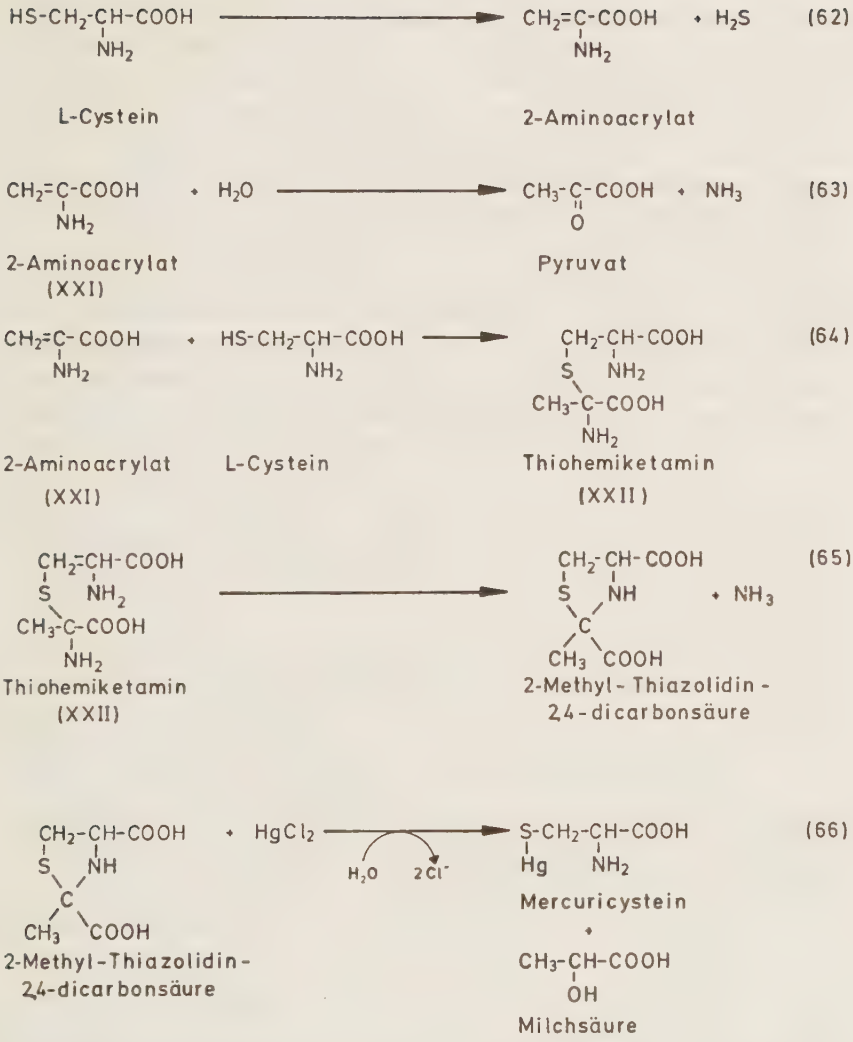
Beim Vergleich des Verhaltens der unbekannten Fraktionen P-1 und P-2 auf der Trisacryl GF05-Säule, die wegen ihrer ähnlichen Eigenschaften zusammen diskutiert werden, mit bekannten Verbindungen (Tab. 33) kommen höchstens Mercaptopyruvat für P-1 und S-Sulfocystein, Thiazolidin-4-carbonsäure oder Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure für P-2 in Frage. S-Sulfocystein scheidet als mögliche Strukzur für P-2 aus, da es, entgegen P-2, in der Dünnschichtelektrophorese (3.3.2.2 ; Cellulose pH 2,0) zur Anode wandert. Auch dürfte es sich nicht um Thiazolidin-4-carbonsäure handeln, die durch die Reaktion von Formaldehyd und Cystein gewonnen wird (RATNER und CLARKE 1937), da diese Verbindung im Gaitonde-Test keine positive Reaktion liefert (Tab. 6). Somit konzentriert sich die Suche auf Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure und seine Derivate. Wie aus Tab. 33 hervorgeht, treten zwei Fraktionen P-2 und Cystein auf, wobei P-2 die gesuchte Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure darstellt. Diese Verbindung zeigt überraschenderweise im sauren Ninhydrinnachweis eine positive Reaktion (Abb. 13).



Seine Synthese findet in Analogie zu Formaldehyd durch den nucleophilen Angriff der Aminogruppe des ß-Aminothiols Cystein an die Carbonylgruppe der Glyoxylsäure statt (60), wobei diese Addition ein Carbinolaminderivat (XIX) ergibt. Dieser Schritt ist unter den gewählten pH-Bedingungen (pH 6,5)

geschwindigkeitsbestimmend (KALLEN 1971 a,b). Nach anschließender Dehydratation bildet sich eine Schiff'sche Base (XX), die durch den intramolekularen Angriff des Schwefelatoms an das kationische Imin schnell zum Ringschluß führt, wobei Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure entsteht (61). Obwohl diese Verbindung unter Raumtemperatur stabil ist, wird sie schnell mit 1 N Salzsäure hydrolisiert (GREENSTEIN und WINITZ 1961), was aber bei eigenen Hydrolyseversuchen für diese Verbindung nur in Spuren beobachtet werden konnte. 1 µmol Thiazolidin-4-carbonsäure wird dagegen mit 0,25 M Cadmiumchlorid unter gleichen Bedingungen zu 540 nmol Cystein gespalten. Dabei entsteht Cystein, welches spezifisch mit dem Gaitonde-Reagenz als typisches Gaitonde-Spektrum (Abb. 2) nachgewiesen werden kann. Ein nucleophiler Angriff der Thiolgruppe an die Carbonylgruppe der Glyoxylsäure, kann nicht ausgeschlossen werden, wie er weiter unten für die enzymatische Bildung von 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure sowie die Reaktion von Pyridoxalphosphat mit Cystein diskutiert wird (Schema E,G).

Bei dem Versuch der Identifizierung von P-2 muß auch 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure in Erwägung gezogen werden, die wegen ihrer Ähnlichkeit mit der Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure auch ein ähnliches Verhalten zeigen sollte. Aus der Literatur (KREDICH et al. 1973)war bekannt, daß Salmonella typhimurium mit der L-Cysteindesulfhydrase nicht nur Schwefelwasserstoff und Pyruvat aus Cystein, sondern auch 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure bilden kann, wobei hohe Cysteinmengen die Ausbeute dieses Produktes stark erhöhen können.
Im Vorgriff auf die Diskussion der Reaktionsmechanismen von Cysteinsynthase, L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthetase (Schema G) sei hier schon (62) kurz erwähnt, daß L-Cystein mit dem Enzym unter Freisetzung von Schwefelwasserstoff als α-Aminoacrylat gebunden wird (XXI), welches entweder zu Pyruvat und Ammoniumionen zerfallen kann (63), oder mit einem weiteren Molekül Cystein zu einem Thiohemiketamin (XXII) reagieren kann (64),welches unter Freisetzung von Ammoniak einen Ringschluß zu 2-Methyl-Thiazolidin-2,4 dicarbonsäure macht (65). Dieser Reaktionsweg steht im Gegensatz zu dem der Synthese von Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure (61), wo die Bildung einer Schiff' schen Base (XX) als Intermediat diskutiert wird.
Obwohl bisher keine detaillierte Angaben über die Eigenschaften dieser Ver - bindung vorliegen, deutet einiges darauf hin, daß es sich bei P-2 um 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure und bei P-1 um sein Thiohemiketamin handeln dürfte, zumal die Zugabe von Cadmiumchlorid bzw. Quecksilberchlorid zu erhöhten Cysteinwerten nach Gleichung (66) führt (SHEENAN und YANG 1958). Hierbei wird ein Mercuricystein und Milchsäure gebildet (66). Ein Sulfoxid der 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure bzw. seines Thiohemiketamins,



wie es schon beobachtet wurde, kann ausgeschlossen werden, da eine Hydrolyse mit dem Gaitonde-Reagenz eine Cysteinsulfon- bzw. -sulfinsäure ergeben würde, die aber mit dem Gaitonde-Reagenz nicht positiv ist.

Die Fraktion P-1 kann kein Mercaptopyruvat sein, da diese Verbindung ebenfalls keine positive Reaktion mit dem Gaitonde-Reagenz zeigt (Tab.6). Seine Struktur als Thiohemiketamin ist ebenso denkbar, wie die eines Carbinolderivates (XIX), zumal Spuren einer freien Aminogruppe mit dem neutralen Ninhydrinnachweis,

wie auch Spuren einer freien Thiolgruppe mit DTNB gefunden werden (Tab. 32). Die Hydrolyse dieser Verbindung ergab keine eindeutigen Ergebnisse. Beide Verbindungen scheinen beim Wachstum auf Cystein und Cysteinderivaten häufig gebildet zu werden, wobei sich besonders Spinacea und Lemna zu seinem weiteren Studium gut eignen. Über die Bedeutung der Verbindung für den Stoffwechsel ist bisher nichts bekannt, doch könnte 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure ein Schwefelspeicher sein, der bei überschüssigem Cystein bevorzugt gebildet wird, um so das Thiol-- Disulfidgleichgewicht der Zelle nicht zu stören . So hat RENNENBERG (1981) gezeigt, daß Tabak beim Wachstum auf L-Cystein dieses fast vollständig aufnimmt und die Zelle mit Cystein überschwemmt. Zudem wird die Produktion des Zellgiftes Schwefelwasserstoff reduziert.2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure scheint im Laufe des Wachstums von Lemna wieder metabolisiert werden zu können, da spätere Extraktionen keine hohen Cysteinsynthase-Nullwerte ergaben (Ergebnisse nicht dargestellt). Andererseits können Thiazolidinderivate als "Thioprolin"-derivate in den Prolinmechanismus eingreifen, wie dies für Thiazolidin-4-carbonsäure bei Hordeum gezeigt wurde (ELTHON und STEWART 1984). Thiazolidinderivate werden auch mit dem Hormonhaushalt der Pflanzen in Verbindung gebracht, da 2-Thioxothiazolidin-4-carbonsäure bei Rettichsämlingen als Hemmstoff wirkt (HASE et al. 1983).

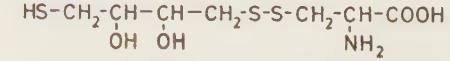
Neben diesen beiden Fraktionen werden bei Raps zwei andere Gaitonde-positive Verbindungen gefunden, die aber keine freie Thiolgruppe besitzen. Sie werden in der Ammoniumhydroxid-Fraktion der Dowex 50 WX 8-Säule und in den Fraktionen bei 142 ml und 190 ml der Trisacryl GF05-Säule gefunden (KERNER 1983).

Obwohl weitergehende Informationen noch ausstehen, so scheinen doch zumindest 6 Fraktionen bei Pflanzen zu existieren, die im Gaitonde-Test erfaßt werden.

Die Versuche legen außerdem die Existenz einer Cysteinracemase nahe, auf die unter 4.4 näher eingegangen werden soll.

Die Natur der Fraktion P-3 liegt noch völlig im Dunkeln, wobei aber Hinweise existieren, daß es sich um ein Thiazolidinderivat des Cysteinäthylesters oder ein N-substituiertes Cysteinderivat handeln könnte (Tab. 32 ; N-Acetylcystein Fr. 25 = 62 ml).

Die Fraktion P-4 scheint ein Addukt von Cystein und DTE zu sein. Eine enzymatische Bildung ist wenig wahrscheinlich, da P-5 bereits chemisch gebildet wird (Tab. 32). Es könnte sich daher um das DTE-Cystein-Disulfidaddukt (XXIII) handeln.



(XXIII)

Bei den Faktionen P-5 und P-6 handelt es sich um thioltragende Verbindungen, deren Natur unbekannt ist.
Die Angabe von chemischen Strukturen ist erst nach vollständiger Aufreinigung und Ermittlung der massenspektrometrischen, NMR- und anderer Daten möglich.

3.7 Cysteinsynthase aus Chlorella fusca 211-8b

Ausgangspunkt der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war die Regulation der Cysteinsynthase bei Chlorella gewesen. Da in vivo Versuche wegen der zahlreichen Störfaktoren selten eindeutige Aussagen zulassen, sollte die Cysteinsynthase zur Abklärung dieses Themenkomplexes angereichert und näher untersucht werden. Dabei galt es die Frage zu klären, ob die L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthetase Seitenaktivitäten dieses Enzym oder eigene Proteine sind. Auch war es von Interesse, die S-Sulfocysteinsynthase zu untersuchen sowie die Stellung der Thiosulfatreduktase zu klären.

3.7.1 Aufreinigung der Cysteinsynthase

Das Enzym wurde aus Chlorellakulturen gewonnen, die nach 2.1.1.1 auf einem Sulfatmedium (2×10^{-4} M) in sechszehn 10 l-Flaschen gezogen worden waren. Nach 5-tägigem Wachstum erreichten die Kulturen eine durchschnittliche optische Dichte bei 680 nm von 0,6 und einer Durchschnittszellzahl von $2{,}55 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium. Die Gesamtchlorophyllmenge betrug 240 mg. Der Rohextrakt wurde wie unter 2.1.1.2 beschrieben, gewonnen und folgenden weiteren Reinigungsschritten unterworfen.
In Tab. 34 sind die Daten dieser Aufreinigung zusammengefaßt. Es sei schon an dieser Stelle erwähnt, daß Cysteinsynthase, L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthetase mit fast gleichen Anreicherungsfaktoren gewonnen wurden, wohingegen S-Sulfocysteinsynthase, Thiosulfatreduktase und D-Cysteindesulfhydrase während der Aufreinigung weitgehend abgetrennt werden konnten.

3.7.1.1 Fällungen

3.7.1.1.1 Polyminfällung

Der Rohextrakt wurde bei der Anreicherung mit 10 µl Polymin/ml Rohextrakt nach 2.6.1 behandelt. Wie aus Tab. 34 hervorgeht, bleiben dabei die Cysteinsynthase (97 %), die L-Cysteindesulfhydrase (85 %), die ß-Cyanoalaninsynthetase (96 %), die S-Sulfocysteinsynthase (75 %), die Thiosulfatreduktase (88 %) und die D-Cysteindesulfhydrase (40 %) weitgehend im Überstand. Eine weitere Zugabe

Tab. 34 : Übersicht über den Aufreinigungsgang der Cysteinsynthase

Fraktion	Cysteinsynthase				L-Cysteindesulfhydrase				ß-Cyanoalaninsynthetase			
	SA	R	TA	A	SA	R	TA	A	SA	R	TA	A
RE	2,1	1,00	24984,0	1,00	17,2	1,00	207,0	1,00	22,0	1,00	264,7	1,00
PI	2,7	1,38	7283,0	0,29	60,8	3,53	158,6	0,76	98,4	4,50	256,7	0,96
ASF	0,4	0,21	1014,0	0,04	5,6	0,32	13,6	0,65	10,5	0,50	25,4	0,09
G-50-I	1,0	0,50	1677,0	0,07	30,7	1,78	51,2	0,24	28,5	1,30	47,3	0,17
DEAE	34,9	16,80	3901,0	0,16	f	f	f	f	f	f	f	f
G-50-II	40,7	20,10	3582,0	0,14	137,6	8,00	12,1	0,06	181,1	8,20	15,9	0,06
	S-Sulfocysteinsynthase				Thiosulfatreduktase				D-Cysteindesulfhydrase			
	SA	R	TA	A	SA	R	TA	A	SA	R	TA	A
RE	83,1	1,00	997,0	1,00	110,3	1,00	1323,0	1,00	56,4	1,00	676,6	1,00
PI	12,9	0,55	338,0	0,33	442,3	4,01	1154,0	0,87	105,4	1,86	274,8	0,40
ASF	13,6	0,16	32,8	0,03	71,3	0,64	171,1	0,13	49,0	0,86	117,7	0,17
G-50-I	40,7	0,48	67,7	0,07	34,7	0,31	57,6	0,04	97,3	1,72	161,6	0,23
DEAE	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f
G-50-II	97,9	1,17	8,6	0,01	49,4	0,44	4,9	0,01	0	0	0	0

Die gereinigte Enzymfraktion wurde, wie unter 2.6.1 - 2.6.4 beschrieben, gewonnen. Dazu ließ man Chlorella-kulturen in 10 l-Flaschen auf einem Sulfatmedium (2×10^{-4} M; 2.1.1.1) wachsen. Die einzelnen Anreicherungs-stufen sind :

RE = Rohextrakt, hergestellt nach 2.1.1.2
PI = Polyminfällung nach 2.6.1 mit 10 µl/ml Rohextrakt
ASF = Ammoniumsulfatfällung nach 2.6.2 von 35 - 80 % Sättigung
G-50-I = Gelchromatographie an Sephadex-G-50 nach 2.6.3 I.Aufreinigung
DEAE = Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephacel nach 2.6.4
G-50-II = Gelchromatographie an Sephadex-G-50 nach 2.6.3 mit der gesammelten Enzymfraktion der DEAE-Sephacel-Säule (Abb. 38) II. Aufreinigung

SA = spezifische Aktivität : Cysteinsynthase : µmol/mg Protein/h
L-Cysteindesulfhydrase, D-Cysteindesulfhydrase, ß-Cyanoalaninsynthetase, Thiosulfatreduktase, S-Sulfocysteinsynthase immer nmol/mg Protein/h
TA = Gesamtaktivität : alle Enzyme µmol/h
R = Reinheit
A = Ausbeute
f = Daten fehlen

von 10 µl/ml Polymin fällt besonders die Cysteinsynthase (41 %) und die L-Cysteindesulfhydrase (41 %) aus. Da ein Auflösen der gefällten Enzyme nur schwer gelingt, wurde auf diesen zusätzlichen Fällschritt verzichtet. Die Bilanzierung der Tab. 34 kann durch einen negativen Einfluß des Polymins verfälscht worden sein.

3.7.1.1.2 Ammoniumsulfatfällung

Die Auftrennung der Proteine mittels Ammoniumsulfat geschah nach 2.6.2 . Dabei enthielt der Niederschlag zwischen 35 - 80 % Sättigung die meiste Aktivität der Cysteinsynthase (90%), der S-Sulfocysteinsynthase (76 %) und der Thiosulfatreduktase (72 %). Ein weiterer Trennungsschritt bei 55 % Sättigung war nicht empfehlenswert, da die Hauptaktivität der Cysteinsynthase (2/3) in der Fraktion zwischen 55 - 80 %, die der Thiosulfatreduktase und der S-Sulfocysteinsynthase (2/3) in der Fraktion zwischen 35 - 55 % zu finden sind und somit erhebliche Enzymmengen verloren gingen. Der starke Abfall der spezifischen Aktivitäten der Enzyme (Tab. 34) bei diesem Reinigungsschritt dürfte z.T. auf den negativen Einfluß des Ammoniumsulfates auf die Enzymaktivität selbst zurückzuführen sein. So konnte gezeigt werden, daß 2 M Ammoniumsulfat die Cysteinsynthase um 54 %, die L-Cysteindesulfhydrase um 72 %, die ß-Cyanoalaninsynthetase um 90 %, die Thiosulfatreduktase um 57 %, die S-Sulfocysteinsynthase um 48 % und die D-Cysteindesulfhydrase um 0 % hemmt, wobei stets die Enzymwerte mit einem unter diesen Bedingungen gemessenen Eichwert von Cystein bzw. Schwefelwasserstoff in den Testen 2.5.1 - 2.5.4 und 2.5.8 umgerechnet wurden (Ergebnisse nicht näher dargestellt).
Es konnte durch den Einsatz von Ammoniumchlorid bzw. Natriumsulfat gezeigt werden, daß hauptsächlich das Ammoniumchlorid einen negativen Einfluß auf die Enzymaktivitäten hat. Eine Dialyse der Enzymfraktion scheint daher vor den Enzymtesten angebracht.

3.7.1.2 Säulentrennungen

3.7.1.2.1 Gelchromatographie an Sephadex-G-50 1. Aufreinigung

Die in 3.7.1.1.2 in der Fraktion 35 - 80 % Ammoniumsulfatsättigung gewonnenen Enzyme wurden nach 2.6.3 auf eine Sephadex-G-50-Säule gegeben (Abb. 35). Es sei erwähnt, daß es neben dem dargestellten Proteinausschußpeak noch einen weiteren Proteinpeak bei ca. 300 ml gibt, der nicht mehr dargestellt wurde und aus spezifisch gebundenem Protein besteht. Die Enzymaktivitäten der Cysteinsynthase, L-Cysteindesulfhydrase, der ß-Cyanoalaninsynthetase sowie der D-Cysteindesulfhydrase werden mit dem Ausschußpeak eluiert, während die Thiosulfatreduktase und die S-Sulfocysteinsynthase ein verzögertes Elutionsverhalten zeigen, wobei fast gleich große Enzymumsätze bezüglich der Schwefelwasserstoffreisetzung beobachtet werden. Die Raten der ß-Cyanoalaninsynthetase sind ungefähr doppelt so groß wie die der L-Cysteindesulfhydrase.

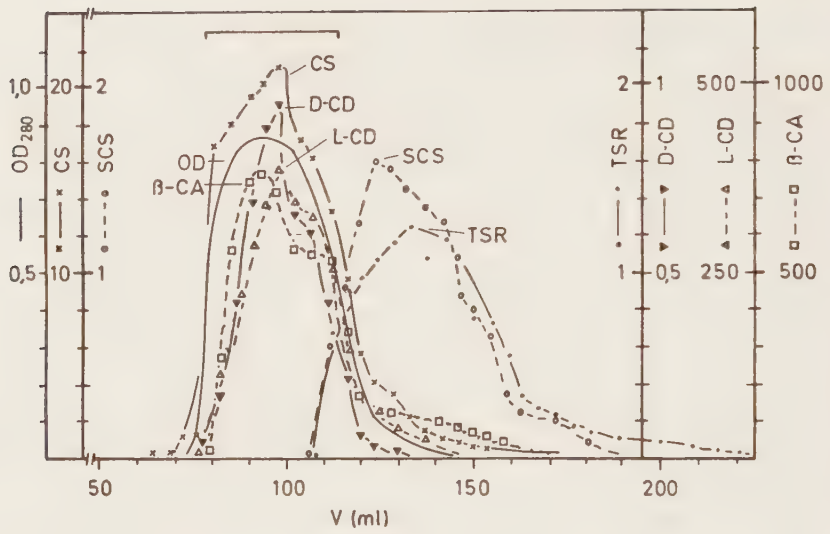


Abb. 35 : Gelchromatographie an Sephadex-G-50 I. Aufreinigung

Die Säule wurde nach 2.6.3 mit der angereicherten Enzymfraktion von 35 - 80 % Ammoniumsulfatsattigung in drei Portionen zu je 0,8 g Protein beladen und in der dort beschriebenen Weise eluiert und ausgetestet. Das Fraktionsvolumen beträgt 4,3 ml.

- CS = Cysteinsynthase (µmol Cystein / ml)
- SCS = S-Sulfocysteinsynthase (µmol Cystein / ml)
- L-CD = L-Cysteindesulfhydrase (nmol Cystein / ml)
- ß-CA = ß-Cyanoalaninsynthetase (nmol Cystein / ml)
- TSR = Thiosulfatreduktase (µmol Cystein / ml)
- D-CD = D-Cysteindesulfhydrase (µmol Cystein / ml)

Der Bereich, der zur weiteren Aufreinigung an der DEAE-Sephacel-Säule (Abb. 37) verwendet wurde, ist angezeigt.

Es muß noch besonders hervorgehoben werden, daß Chlorella beim Wachstum auf L-Cysteinäthylester (3×10^{-4} M) eine andere Cysteinsynthase bildet (Abb. 36), die ein stark verzögertes Elutionsverhalten aufweist. In diesem Säulenbereich kann zudem gebundenes Sulfid, bei dem es sich um elementaren Schwefel handeln dürfte (3,5), und Cystein bzw. ein Cysteinderivat, wie der eingesetzte L-Cysteinäthylester, gefunden werden, da sowohl mit dem Thiolnachweis DTNB, wie dem Gaitonde-Nachweis hohe Nullwerte ermittelt wurden.

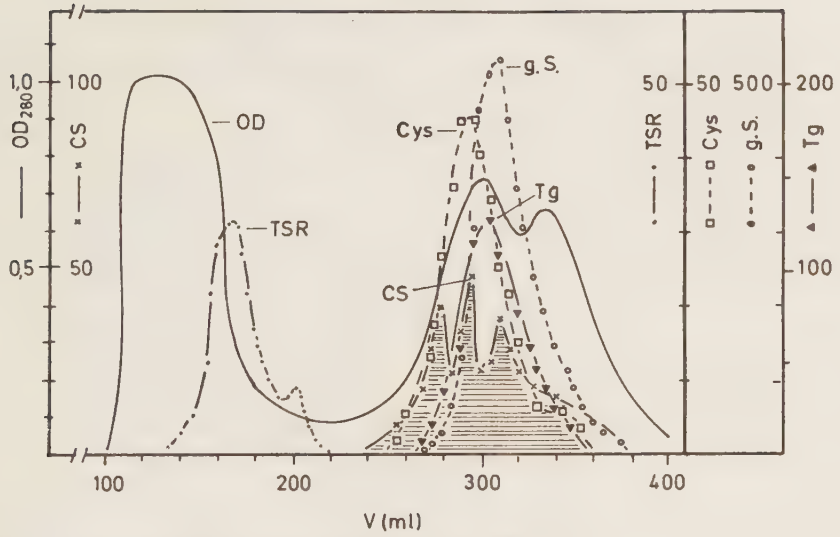


Abb. 36 : Gelchromatographie an Sephadex-G-50

Die Säule wurde mit einem Rohextrakt einer Chlorellakultur beladen, die 4 Tage in einer 10 l Flasche auf einem Sulfatmedium (2.1.1.1), dem 3 x 10^{-4} M L-Cysteinäthylester zugesetzt waren, gewachsen war. Die Elution und Austestung erfolgte wie in Abb. 35, wobei auch der Cysteingehalt, gemessen als Nullwert der Cysteinsynthase (2.5.1), das gebundene Sulfid (2.2.8.1) und der Thiolgehalt (2.2.4) ermittelt wurde.

CS = Cysteinsynthase (nmol / ml) Cys = Cysteingehalt (nmol / ml)
TSR = Thiosulfatreduktase (nmol / ml) g.S. = gebundenes Sulfid (nmol / ml)
Tg = Thiolgehalt (nmol / ml)

3.7.1.2.2 Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephacel

Die mit der Sephadex-G-50-Säule gewonnene Enzymfraktion (Abb. 35) wurde einer Ionenaustauscherchromatographie nach 2.6.4 an DEAE-Sephacel unterzogen (Abb. 37). Auf dieser Säule konnte keine S-Sulfocysteinsynthase mehr nachgewiesen werden. Auffallend ist, daß die Thiosulfatreduktase und die D-Cysteindesulfhydrase wesentlich später als die Cysteinsynthase, L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthetase eluiert werden, wobei letztere fast gleiches Verhalten zeigen. Nur für die Cysteinsynthase kann ein Doppelpeak beobachtet werden. Die Enzymaktivitäten der L-Cysteindesulfhydrase und der ß-Cyanoalaninsynthetase sind annähernd gleich.

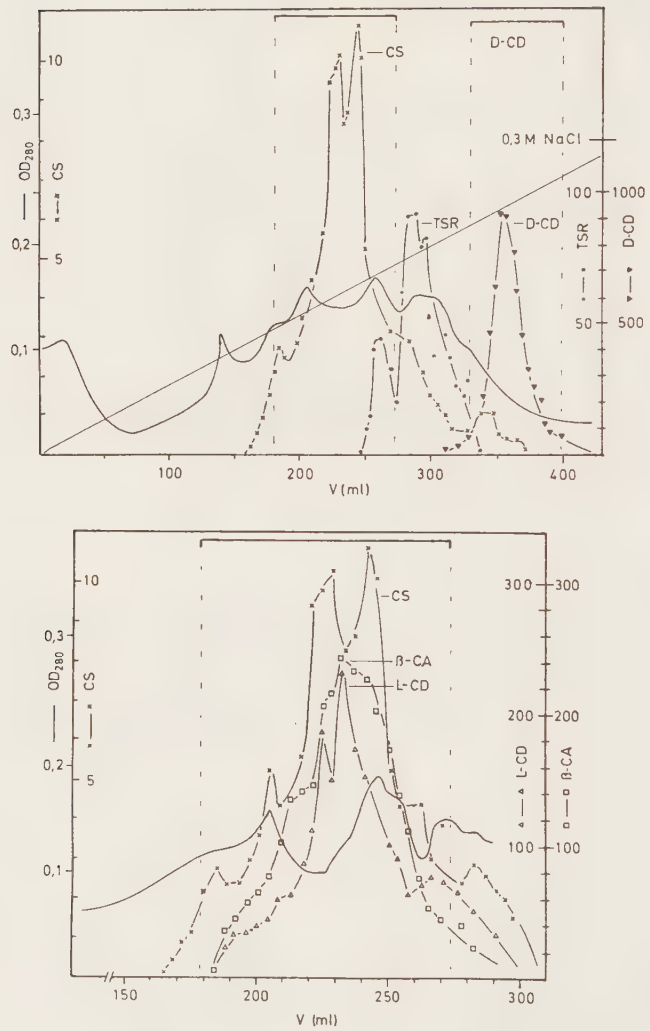


Abb. 37 : Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

Die aktiven Fraktionen nach der Sephadex-G-50 I. Aufreinigung (Abb. 35) wurden nach 2.6.4 an einer DEAE-Sephacel-Säule in 2 Portionen zu je 540 mg Protein eluiert und bestimmt. Die Säule wurde mit einem Natriumchloridgradienten von 0 - 0,4 M in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 (300 ml je Reservoir) behandelt. Die Fraktionsvolumen betrugen 4,1 ml. Die Aktivitäten hatten folgende Einheiten :

× ——— ×	CS	= Cysteinsynthase	(µmol Cystein / ml)
△ ——— △	L-CD	= L-Cysteindesulfhydrase	(nmol H_2S / ml)
□ ——— □	ß-CA	= ß-Cyanoalaninsynthetase	(nmol H_2S / ml)
● ——— ●	TSR	= Thiosulfatreduktase	(nmol H_2S / ml)
▼ ——— ▼	D-CD	= D-Cysteindesulfhydrase	(nmol H_2S / ml)

3.7.1.2.3 Gelchromatographie an Sephadex-G-50 II. Aufreinigung

Die nach 3.7.1.2.2 vereinigten Enzymaktivitäten (Abb. 37) wurden am PM-10 Filter eingeengt und nach 2.6.3 an Sephadex-G-50 rechromatographiert (Abb. 38). Das Elutionsprofil der Cysteinsynthase, L-Cysteindesulfhydrase, und der ß-Cyanoalaninsynthetase ist gleich, wobei die ß-Cyanoalaninsynthetase eine 10-fach höhere Aktivität als die L-Cysteindesulfhydrase aufweist. Diese soweit gereinigte, aber nicht homogene Enzymfraktion wurde einer Charakterisierung in 3.7.2 unterzogen. Auffallend ist, daß nur die Cystein-

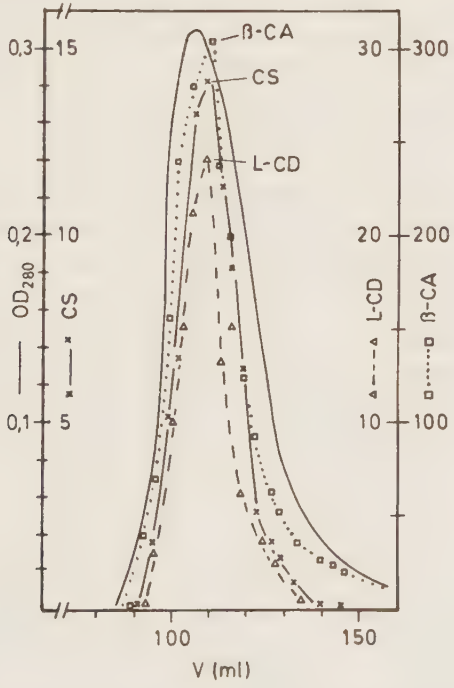


Abb. 38 : Gelchromatographie an Sephadex-G-50 II.Aufreinigung

Die aktiven Fraktionen der DEAE-Sephacel-Säule (Abb. 37 ; 76 mg Protein) wurden über einen PM-10-Filter eingeengt und erneut auf eine Sephadex-G50-Säule gegeben. Die Elution geschah nach 2.6.3 . Die Fraktionsvolumina waren 3,4 ml.

■ ——— ■ CS = Cysteinsynthase (µmol Cystein / ml)
▲ – – – ▲ L-CD = L-Cysteindesulfhydrase (nmol H_2S / ml)
□ ·····□ ß-CA = ß-Cyanoalaninsynthetase (nmol H_2S / ml)

synthase (20-fach), die L-Cysteindesulfhydrase (8-fach) und die ß-Cyanoalaninsynthetase (8-fach) in fast gleichem Umfang angereichert wurden, während die S-Sulfocysteinsynthase, Thiosulfatreduktase und die D-Cysteindesulfhydrase weitgehend abgetrennt werden konnten (Tab. 34). Die Ausbeuten sind auch für die ersteren Enzyme sehr niedrig. Somit enthält die angereicherte Enzymfraktion hauptsächlich die Cysteinsynthase (Spez. Akt. 40,7 µmol/mg/h) und zusätzlich L-Cysteindesulfhydrase (Spez. Akt. 137,6 nmol/mg/h), ß-Cyanoalaninsynthetase (Spez. Akt. 181,1 nmol/mg/h), S-Sulfocysteinsynthase (97,9 nmol/mg/h), Thiosulfatreduktase (Spez. Akt. 49,8 nmol/mg/h) und auch ß-Mercaptopyruvatsulfotransferase, (Spez. Akt. 87,7 nmol /mg/h), die nach SCHMIDT (1984) gemessen wurde. Eine D-Cysteindesulfhydrase konnte nicht mehr gefunden werden.

3.7.1.2.4 Affinitätschromatographie an Affigel-Blue-A

In Vorversuchen wurde das Elutionsverhalten der einzelnen Enzyme an Affigelen untersucht, um die optimale Affinitätssäule zu ermitteln. Dabei stellte es sich heraus, daß sich zur Anreicherung der Cysteinsynthase nur Affigel-Blue-A (93% gebunden), Affigel-Red-A (87 %) und Affigel-Green-A (85 %) eignen, da das Enzym bei den Gelen Affigel-Orange-A bzw. -Blue-B nicht gebunden wird.

Obwohl die Auftrennung einer Fraktion, die nach Polymin- (25 µl/ml) und Ammoniumsulfatfällung 40 - 85 % direkt auf das Affigel-Blue-A gegeben wurde, mindestens zwei. eher mehrere Fraktionen lieferte (Abb. 39), ist dieses Verfahren schlecht zur Aufreinigung der Cysteinsynthase geeignet, da stets hohe

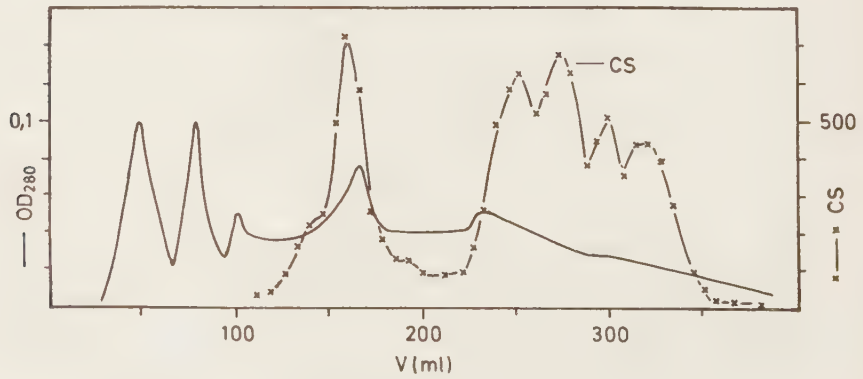


Abb. 39 : Affinitätschromatographie an Affigel-Blue-A

Eine Enzymfraktion, die als Rohextrakt (2.1.1.2) bei der Polyminfällung (2.6.1 ; 25 µl/ml Rohextrakt) im Überstand blieb, wurde mit 35 - 80 % Ammoniumsulfatsättigung gewonnen und auf eine Affigel-Blue-A-Säule nach 2.6.6 gegeben (173 mg Protein). Das Fraktionsvolumen betrug 6,7 ml. Es wird nur die Cysteinsynthase (x——x) in µmol Cystein / ml angegeben.

Aktivitätsverluste (90 %) beobachtet wurden. Deshalb unterblieb die weitere Aufreinigung der Fraktion nach der zweiten Sephadex-G-50-Säule (Abb. 38) mit diesem Verfahren.

3.7.1.2.5 Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Biogel-A

Auf diesem Ionenaustauschergel (Abb. 40) zeigen die Cysteinsynthase und L-Cysteindesulfhydrase ein gleiches Elutionsverhalten, während die D-Cysteindesulfhydrase deutlich abgetrennt werden kann. Sie wurde aber zur Enzymaufreinigung nicht verwendet.

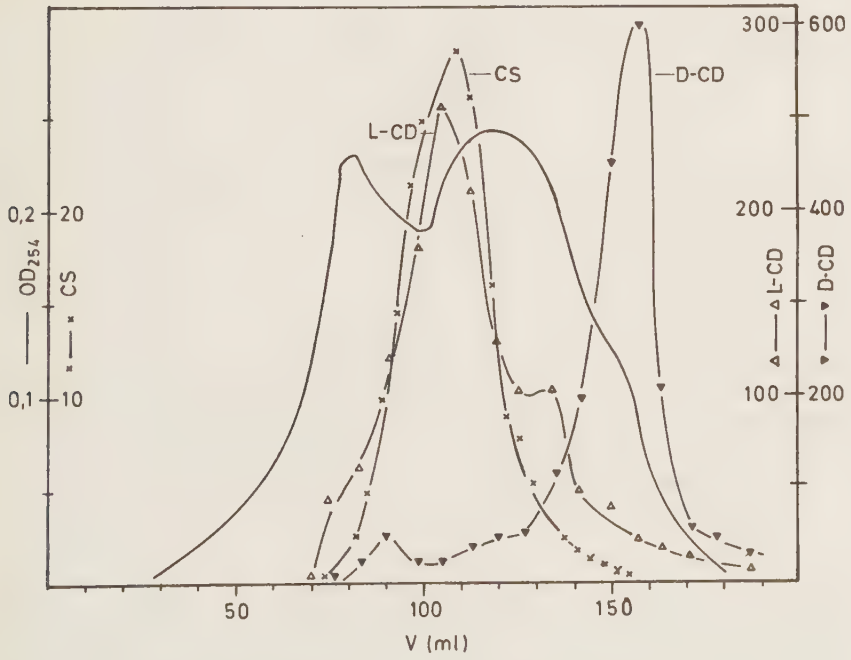


Abb. 40 : Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Biogel A

Die Säule wurde mit einem Rohextrakt, der bei der Polyminfällung 2.6.1 mit 25 µl/ml Rohextrakt im Überstand blieb und bei der Ammoniumsulfatfällung 2.6.2 zwischen 40 - 85 % Sättigung fiel, beladen und wie unter 2.6.8 beschrieben, eluiert. Es wurden Fraktionen zu 3,7 ml gesammelt und nach 2.6.3 getestet.

× ——— × CS = Cysteinsynthase (µmol Cystein / ml)
▲ ——— ▲ L-CD = L-Cysteindesulfhydrase (nmol H_2S / ml)
▼ ——— ▼ D-CD = D-Cysteindesulfhydrase (nmol H_2S / ml)

3.7.1.2.6 Gelchromatographie an Biorad-A 1,5m

Die analytische Gelchromatographie der angereicherten Enzymfraktion (Abb. 41) zeigt ein fast identisches Elutionsverhalten von Cysteinsynthase, L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthetase, wobei ein Molekulargewicht von 68 000 D ermittelt wurde (Abb. 42).

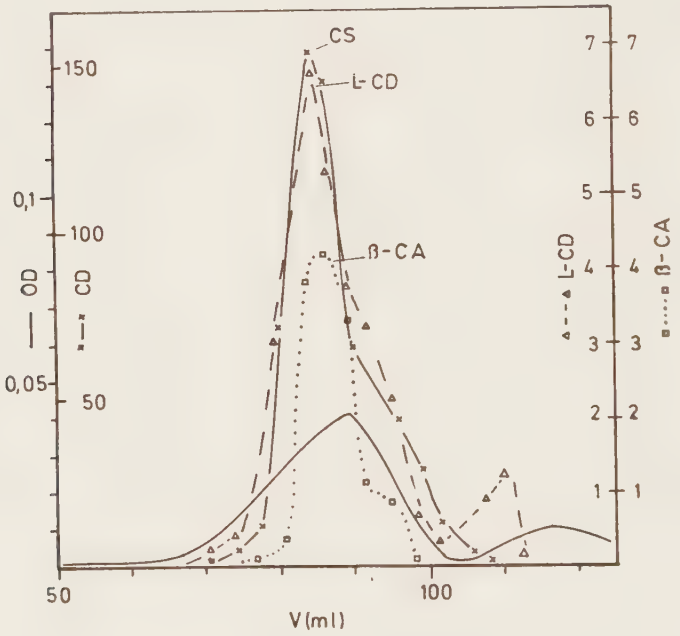


Abb. 41 : Gelchromatographie an Biorad-A 1,5 m

Die Eichung dieser Säule geschah nach 2.6.7 in Einzeltrennungen mit Sulfat als Marker, das mit Bariumacetat nachgewiesen wurde. Es wurden 1 mg von Cytochrom C (MG 12 500), Chymotrypsinogen (MG 25 000), Hühnerserumalbumin (MG 45 00), Rinderserumalbumin (MG 68 000) und Aldolase (MG 158 000) einzeln mit Sulfat aufgetragen und mit dem Proteinnachweis 2.2.2 bestimmt.
Das Molekulargewicht der gereinigten Cysteinsynthase von Abb. 38 wurde mit 3,56 mg Protein nach 2.5.1 ermittelt.

CS = Cysteinsynthase (nmol Cystein / ml)
L-CD = L-Cysteindesulfhydrase (nmol H_2S / ml)
ß-CA = ß-Cyanoalaninsynthetase (nmol H_2S / ml)

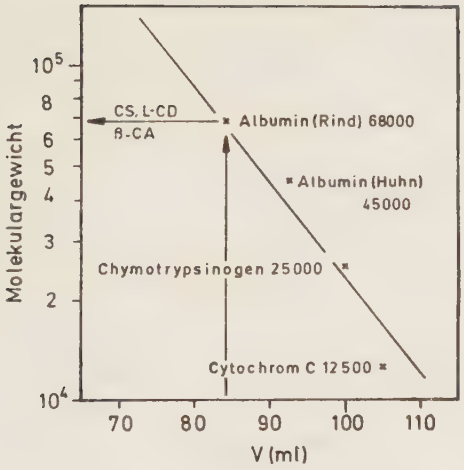


Abb. 42 : Molekulargewichtsbestimmung

Hierzu werden die Ergebnisse von Abb. 41 verwendet.

3.7.2 Eigenschaften der Cysteinsynthase

Die bisher bekannten Eigenschaften der Cysteinsynthase von Chlorella reichen nicht aus (SCHMIDT 1977b), um die Frage der Seitenaktivitäten dieses Enzyms zu klären.Deshalb sollen hier die Eigenschaften der L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthetase im Vergleich zur Cysteinsynthase gezeigt werden.

3.7.2.1 Proteinabhängigkeit

Aus Abb. 43 geht hervor, daß die drei Enzymaktivitäten durch steigende Proteinmengen in gleicher Weise gesteigert werden, wobei die Cysteinsynthase aber eine höhere spezifische Aktivität besitzt. Für die weiteren Versuche wurden meist 8,9 µg Protein für die Cysteinsynthase und 71,2 µg Protein für die beiden anderen Aktivitäten eingesetzt.

3.7.2.2 pH-Optimum

Die Bestimmung des pH-Optimums stößt bei allen Enzymen auf Schwierigkeiten. Wie aus Abb. 44a hervorgeht, liegt das pH-Optimum der Cysteinsynthase bei 7,0 oder niedriger, um bei höheren Werten stark abzusinken. Wie der enzymfreie Nullwert zeigt, nimmt die Sulfidmenge bei steigenden pH-Werten zu, wohingegen

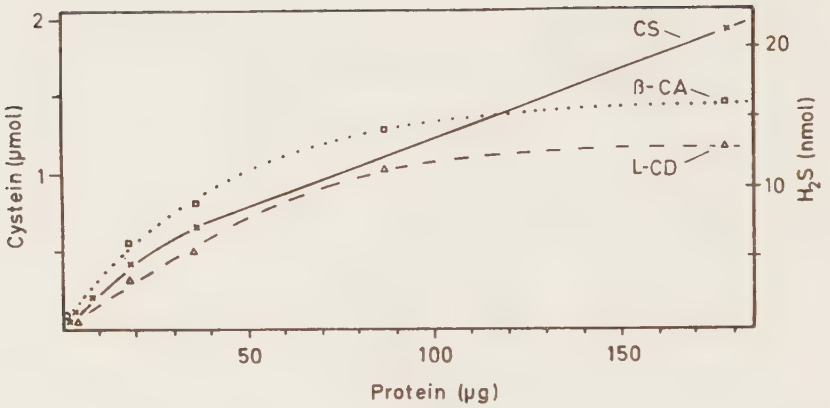


Abb. 43 : Proteinabhängigkeit

Die Proteinabhängigkeit der Cysteinsynthase (2.5.1), der L-Cysteindesulfhydrase (2.5.3.1) und ß-Cyanoalaninsynthetase (2.5.8) wurde mit der angereicherten Enzymfraktion (Abb. 38) und den angegebenen Proteinmengen bestimmt.

die freie Aminogruppe des O-Acetylserins stetig abnimmt. Die maximale Enzymaktivität folgt nur etwas verzögert der Abnahme des O-Acetylserins, wobei die steigende Schwefelwasserstoffkonzentration bei pH 7,5 eine Verzögerung der Enzymabnahme bewirkt.

Bei der Berechnung der Versuchsdaten der L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthetase war es notwendig, die pH-abhängige Dissoziation und Löslichkeit des Schwefelwasserstoffes durch einen Eichwert zu berücksichtigen (Abb. 44b). Die L-Cysteindesulfhydrase zeigt bei pH 8,0 ein relatives Maximum, um im alkalischen Milieu größte Umsätze zu zeigen. Die ß-Cyanoalaninsynthetase dagegen besitzt bei pH 7,5 ein starkes und bei pH 9,5 ein schwaches Maximum. Die Austauschreaktion mit S-Methyl-L-Cystein zeigt bei pH 7,0 ein absolutes und bei 10,0 ein relatives Maximum.

Die vier Enzymaktivitäten zeigen aufgrund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften ihrer Substrate sehr unterschiedliche pH-Optima.

Für die weiteren Untersuchungen wurden deshalb die Cysteinsynthase bei pH 7,5 , die L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthase bei pH 10,6 bestimmt.

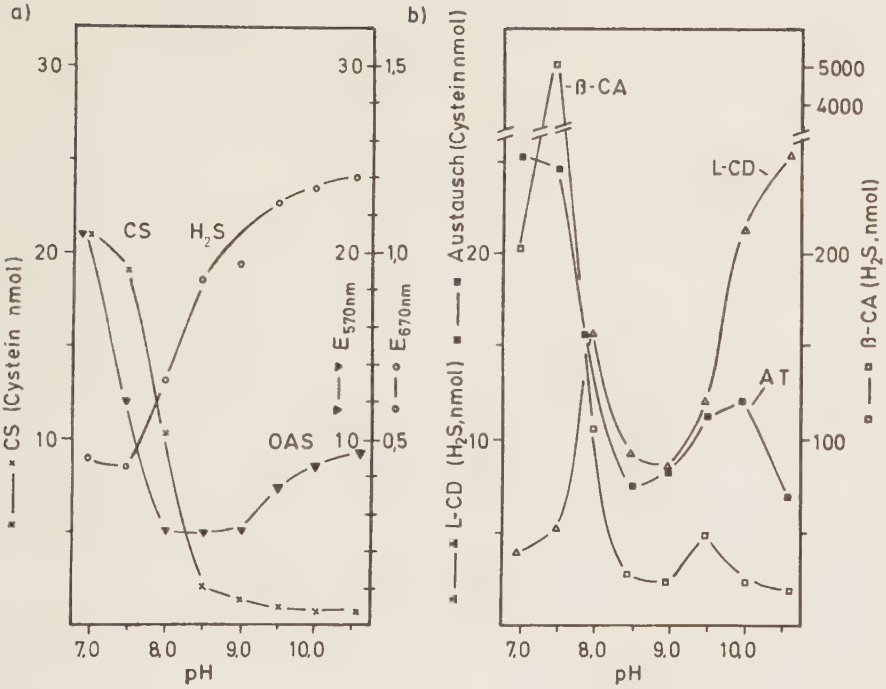


Abb. 44 : pH-Optima

a) Cysteinsynthase

Der Enzymtest 2.5.1 wurde mit 178 µg Protein der angereicherten Enzymfraktion (Abb. 38) bei den genannten pH-Werten durchgeführt. x——x nmol Cystein / ml

Der Nullwert dieses Testes wurde nicht mit dem Gaitonde-Reagenz, sondern mit dem neutralen Ninhydrin-Reagenz (2.2.3.1) auf O-Acetylserin untersucht. ▼——▼

Zudem bestimmte man den Schwefelwasserstoffgehalt nach 2.2.5 des gleichen Nullwertes . o——o

b) L-Cysteindesulfhydrase, ß-Cyanoalaninsynthetase und Austauschreaktion.

Die L-CD wurde nach 2.5.3.1 mit 71,2 µg Protein der obigen Enzymfraktion gemessen. Δ——Δ nmol H_2S/ml

Die ß-Cyanoalaninsynthetase wurde nach 2.5.8 mit 71,2 µg der obigen Enzymfraktion bestimmt. □——□ nmol H_2S/ml

Die Austauschreaktion wurde im Test 2.5.1 mit S-Methylcystein (5µmol) statt O-Acetyl-L-Serin als Substrat und 89 µg Protein durchgeführt, wobei ein Nullwert ohne Natriumsulfid abgezogen werden mußte und mit dem zugehörigen Eichwert umgerechnet wurde. ■——■

3.7.2.3 Zeitabhängigkeit

Wie aus Abb. 45 hervorgeht, weisen die drei Enzymaktivitäten eine ähnliche Zeitabhängigkeit auf, wobei nach 30 Minuten kaum eine Produktzunahme erfolgt, so daß die Enzymteste nach 30 Minuten gestoppt wurden.

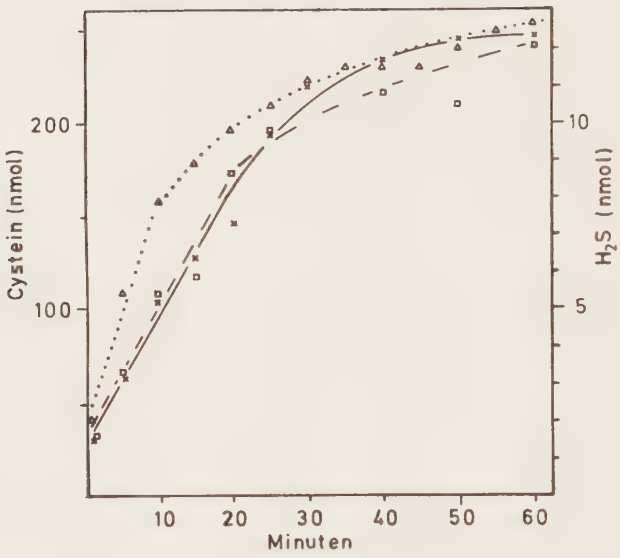
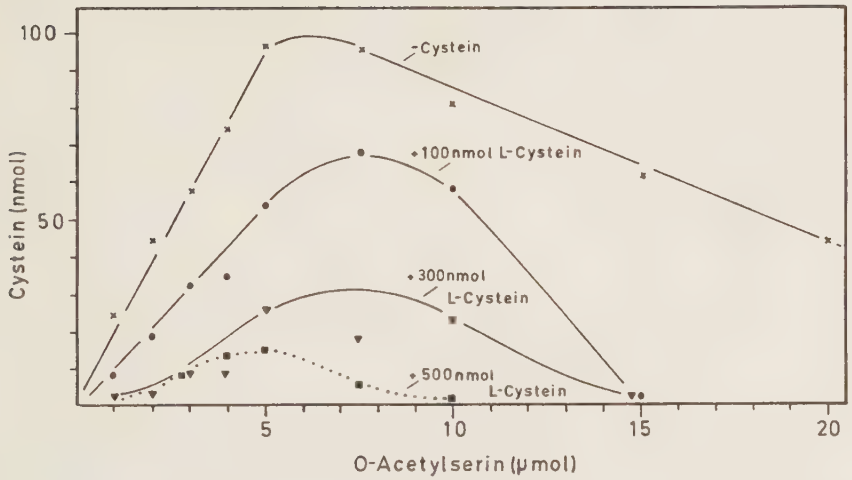


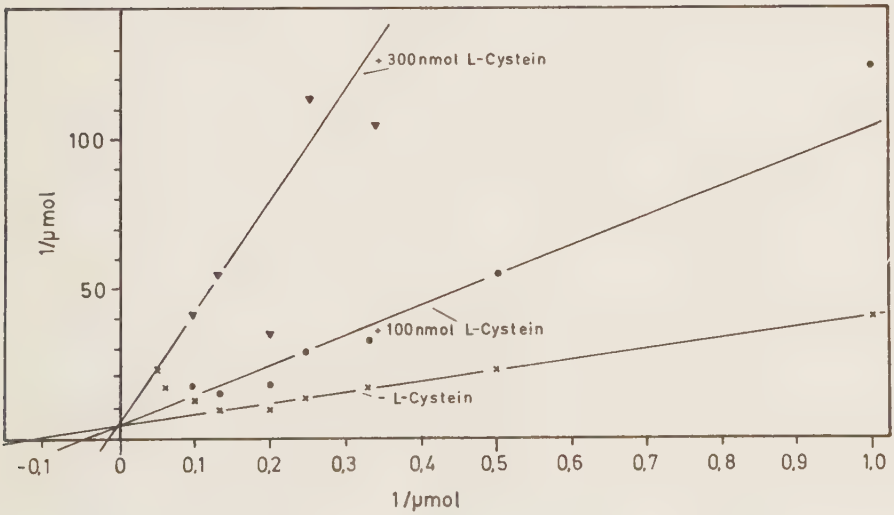
Abb. 45 : Zeitabhängigkeit

Die Cysteinsynthase (x——x nmol Cystein/ml) wurde mit 8,9 µg Protein der angereicherten Enzymfraktion (Abb. 38) nach 2.5.1 gemessen. L-Cysteindesulfhydrase (▲ – – ▲ nmol H_2S/ml) bestimmte man wie auch die ß-Cyanoalaninsynthetase (□····□ nmol H_2S/ml) mit 71,2 µg Protein der genannten Enzymfraktion in den Testen 2.5.3.1 bzw. 2.5.8 .

3.7.2.4 K_m-Werte

Bei der Cysteinsynthase beträgt der K_m bezüglich O-Acetylserin 6,6 mM (Abb. 46), wobei hohe O-Acetylserinmengen eine Substratsättigung bewirken zu scheinen. Zugabe von L-Cystein führt zu einer kompetitiven Hemmung (Abb. 46), die einen K_I-Wert von 48 µM besitzt. Diese Endprodukthemmung ist bei 0,5 mM L-Cystein fast vollständig. Auch Schwefelwasserstoff zeigt eine Substratsättigungskurve (Abb. 47) und hat einen K_m-Wert von 1,42 mM. Der K_m-Wert der L-Cysteindesulfhydrase bezüglich L-Cystein liegt bei 0,33 mM und zeigt ab 8 mM L-Cystein eine Substrathemmung (Abb. 48).
Die ß-Cyanoalaninsynthetase weist den gleichen K_m-Wert für L-Cystein (0,33 mM) auf (Abb. 49) und wird ab 2 mM L-Cystein gehemmt. Cyanid führt bei diesem Enzym zu keiner Hemmung (Abb. 50). Sein K_m-Wert beträgt 12,5 mM.





Tab. 46 : K_m-Bestimmung für O-Acetyl-L-Serin der Cysteinsynthase

Die angereicherte Enzymfraktion (Abb. 38) wurde nach 2.5.1 mit 89 µg Protein und den angegebenen O-Acetyl-L-Serinkonzentrationen ausgetestet. Diese Werte mußten mit den zu jeder OAS-Konzentration gemessenen Cysteineichwerten umgerechnet werden. Zudem gab man in einem weiteren Versuch unter sonst identischen Bedingungen 100 nmol bzw. 300 nmol L-Cystein hinzu, um den Einfluß von Cystein auf das Enzym messen zu können. Von diesen Werten mußten stets die Nullwerte ohne Enzym abgezogen werden.

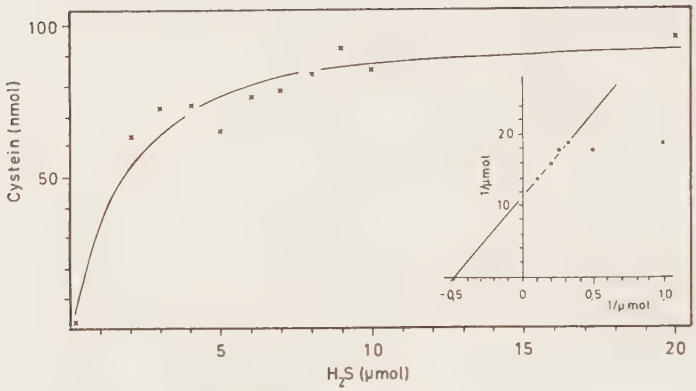


Abb. 47 : K_m-Bestimmung für Schwefelwasserstoff der Cysteinsynthase

Die angereicherte Enzymfraktion (Abb. 38) wurde nach 2.5.1 mit 89 µg Protein und den angegebenen Schwefelwasserstoffkonzentrationen ausgetestet. Die Enzymwerte wurden mit den zu jeder Schwefelwasserstoffkonzentration gemessenen Cystein-Eichwerten umgerechnet.

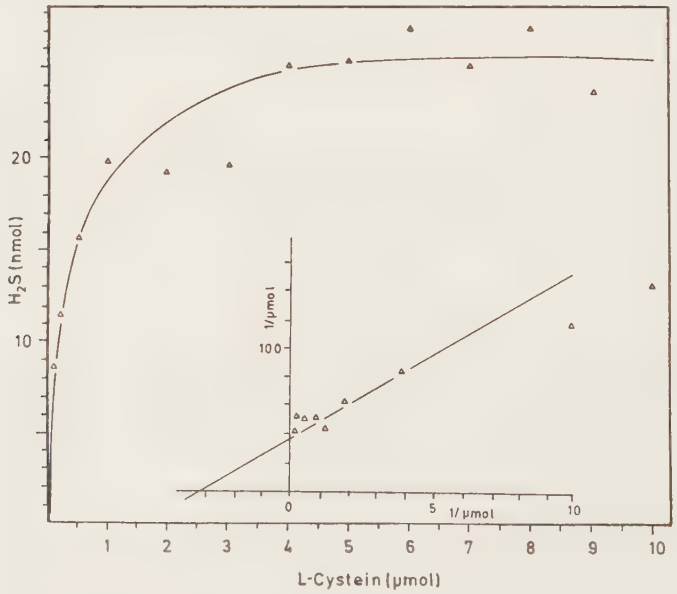


Abb. 48 : K_m-Bestimmung für L-Cystein der L-Cysteindesulfhydrase

Die angereicherte Enzymfraktion (Abb. 38) wurde nach 2.5.3.1 mit 142 µg Protein und den genannten L-Cysteinkonzentrationen gemessen. Die Umrechnung geschah mit einem Schwefelwasserstoff-Eichwert von 100 nmol, der bei jeder L-Cysteinkonzentration ermittelt wurde.

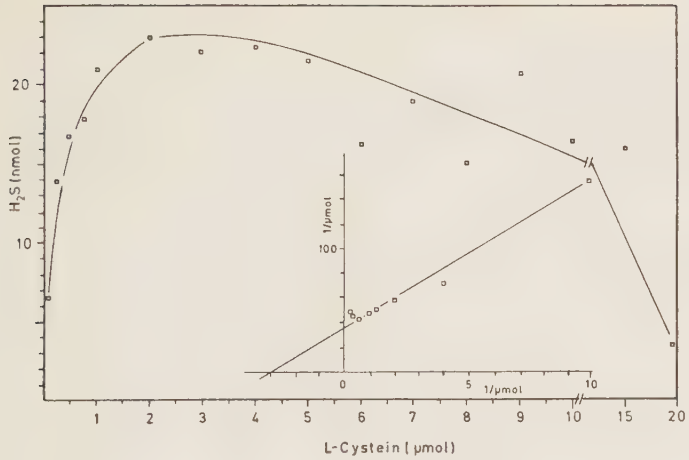


Abb. 49 : K_m-Bestimmung für L-Cystein der ß-Cyanoalaninsynthetase

Die angereicherte Enzymfraktion (Abb. 38) wurde nach 2.5.8 mit 71,2 µg Protein und den genannten L-Cysteinkonzentrationen gemessen und mit den jeweiligen Schwefelwasserstoffeichwerten von 100 nmol umgerechnet.

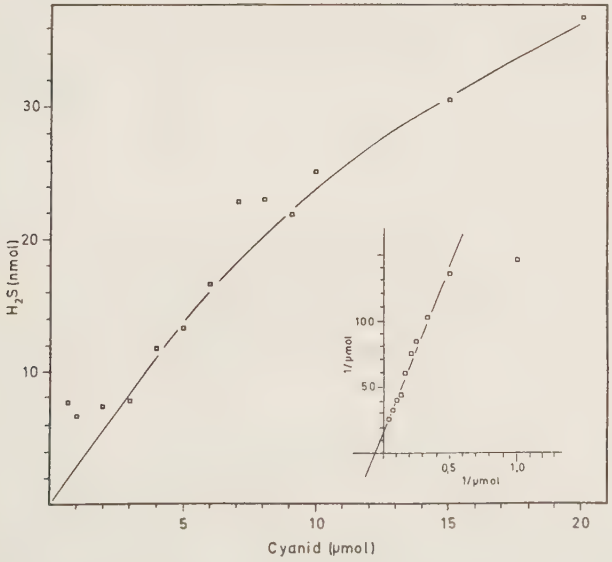


Abb. 50 : K_m-Bestimmung für Cyanid der ß-Cyanoalaninsynthetase

Die angereicherte Enzymfraktion (Abb. 38) wurde nach 2.5.8 mit 71,2 µg Protein und den genannten Cyanidkonzentrationen gemessen und mit den jeweiligen Schwefelwasserstoffeichwerten von 100 nmol umgerechnet.

3.7.2.5 Substratspezifität

3.7.2.5.1 Substratspezifität der Cysteinsynthase

Wie aus Tab. 35 hervorgeht, ist die Cysteinsynthase für O-Acetyl-L-Serin spezifisch, während O-Acetyl-D-Serin sowie Serin und einige Serinderivate nur erheblich geringere Umsätze liefern.

Tab. 35 : Substratspezifität der Cysteinsynthase

Substrat	pH 7,5		pH 10,6	
	Cystein (nmol)	%	Cystein (nmol)	% *
O-Acetyl-L-Serin	615,0	100,00 %	n. b.	n. b.
O-Acetyl-D-Serin	1,6	0,26 %	n. b.	n. b.
Phospho-L-Serin	2,7	0,43 %	11,4	1,8 % *
L-Serin	3,2	0,52 %	7,7	1,2 % *
D-Serin	2,2	0,35 %	10,7	1,7 % *
N-Acetyl-L-Serin	1,4	0,22 %	6,3	1,0 % *

Der Reaktionsansatz wurde nach 2.5.1 durchgeführt und enthielt in 1 ml Endvolumen 100 µmol Tris-HCl pH 7,5 bzw. Tris-freie Base; 3 µmol DTE; 5 µmol Natriumsulfid; 5 µmol Substrat, wie angegeben und Cysteinsynthase von Abb. 38 (89 µg Protein). Es wurden zu jedem Substrat ein Eichwert mit Cystein durchgeführt, mit dem die Enzymwerte umgerechnet wurden.
n.b. = nicht bestimmt * = bezogen auf O-Acetyl-L-Serin pH 7,5 (100 %)

Tab. 36 : Hemmung der Cysteinsynthase

Hemmstoff	Cystein	%
Kontrolle ohne Hemmstoff	487 nmol	100,0 %
S-Sulfo-L-Cystein	334 nmol	68,7 %
S-Methyl-L-Cystein	406 nmol	83,5 %
S-Äthyl-L-Cystein	400 nmol	82,1 %
D/L-Homocystein	756 nmol	155,0 %

Die Reaktionsansätze wurden nach 2.5.1 behandelt und enthielten in 1 ml Endvolumen 100 µmol Tris-HCl pH 7,5 3 µmol DTE; 5 µmol Natriumsulfid; 5 µmol O-Acetyl-L-Serin; 1 µmol Hemmstoff, wie angegeben und Cysteinsynthase von Abb. 38 (89 µg Protein). Für jeden Ansatz wurde stets ein Eichwert mit Cystein (100nmol) mitgemessen. Bei S-Sulfocystein wurde zusätzlich ein Ansatz obiger Zusammensetzung aber ohne Enzym bestimmt, dessen S-Sulfocysteingehalt von dem Cysteingehalt des Enzymwertes abgezogen werden mußte, da S-Sulfocystein Gaitonde-positiv ist (Tab. 6).

Das Enzym wird nur von S-Sulfocystein nach Berücksichtigung der Eigenextinktion im sauren Ninhydrinnachweis deutlich gehemmt (Tab. 36), während die Thioäther S-Methyl- und S-Äthyl-L-Cystein kaum eine Wirkung zeigen. Die Stimulation durch Homocystein ist überraschend.

3.7.2.5.2 Substratspezifität der L-Cysteindesulfhydrase

Die L-Cysteindesulfhydrase ist auch stereospezifisch, da D-Cystein keine Enzymumsätze liefert (Tab. 37). Nur die Cysteinester sind relativ gute Substrate. Das Enzym kann Disulfide wie Cystin oder Homocystin sowie Cysteamin und N-Acetyl-L-Cystein ebensowenig wie Homocystein umsetzen.

Tab. 37 : Substratspezifität der L-Cysteindesulfhydrase

Substrat	Schwefelwasserstoff (nmol)			
	+ DTE	%	- DTE	% *
L-Cystein	26,0	100,0 %		
D-Cystein	0,4	1,5 %		
D/L-Homocystein	0,2	0,7 %		
L-Cystin			0,7	2,6 %
D-Cystin			1,5	5,7 %
L-Homocystein			0,3	1,2 %
D-Homocystein			0,0	0 %
N-Acetyl-L-Cystein	4,2	2,6 %		
Cysteamin	3,2	4,4 %		
L-Cysteinmethylester	16,6	40,7 %		
L-Cysteinäthylester	16,2	62,3 %		

Die Versuche wurden nach 2.5.3.1 durchgeführt und enthielten in 1 ml Endvolumen 100µmol Tris-freie Base ; 2 µmol DTE, wo angegeben; 1 µmol Substrat und die angereicherte Enzymfraktion (Abb. 38 ; 89 µg Protein). Es wurde stets ein Eichwert mit 100 nmol Schwefelwasserstoff gemessen.
* = bezogen auf L-Cystein +DTE (100%)

O-Acetyl-L-Serin stimuliert das Enzym, wenngleich die Umsätze bei diesem pH-Wert erheblich geringer sind (Tab. 38).

3.7.2.5.3 Substratspezifität der ß-Cyanoalaninsynthetase

Dieses Enzym ist wohl auch für L-Cystein spezifischer, doch zeigen einige Disulfide, Homocystein und Cysteamin auch deutliche Umsätze (Tab. 39).

Tab. 38 : Hemmung der L-Cysteindesulfhydrase

Hemmstoff pH 10,6	Schwefelwasserstoff nmol	%
-	51,6	100 %
L-Serin	36,4	70 %
D-Serin	46,2	89 %
Phospho-L-Serin	34,3	66 %
Mercaptoäthanol	79,3	154 %
pH 7,5		
-	5,4	100 %
O-Acetyl-L-Serin	6,6	122 %

Die Versuche wurden nach 2.5.3.1 durchgeführt und enthielten in 1 ml Endvolumen 100 µmol Tris-freie Base, bzw. Tris-HCl pH 7,5 bei O-Acetylserin; 2 µmol DTE; 1 µmol L-Cystein; 1 µmol Hemmstoff und angereichertes Enzym (Abb. 38 ; 178 µg Protein). Es wurde stets ein Eichwert für jeden Hemmstoff gemessen.

Tab. 39 : Substratspezifität der ß-Cyanoalaninsynthetase

Substrat	Schwefelwasserstoff nmol	%	Ketogruppen nmol
a) Substrat I			
L-Cystein	24,4	100,0	f
D-Cystein	10,5	43,0	f
D/L-Homocystein	3,3	13,5	7,1
L-Cystin	9,0	36,8	7,1
D-Cystin	5,0	20,5	3,5
L-Homocystin	5,4	22,1	6,6
D-Homocystin	3,5	14,3	6,9
Cysteamin	9,1	37,6	f
b) Substrat II			
Cyanid	24,4	100,0	
Sulfit	6,3	25,7	
Thiocyanat	7,3	29,8	

Die Versuche wurden nach 2.5.8 durchgeführt und enthielten in 1 ml Endvolumen 100µmol Tris-freie Base; bei der Substratgruppe I 1 µmol der genannten Verbindung bzw. bei der Substratgruppe II 1 µmol L-Cystein; bei der Substratgruppe I 1 µmol Kaliumcyanid bzw. bei der Substratgruppe II 1 µmol der genannten Verbindung und die angereicherte Enzymfraktion (Abb. 38; 89 µg Protein).Zudem wurde stets ein Schwefelwasserstoffeichwert (100 nmol) mitbestimmt, mit dem die Enzymwerte umgerechnet wurden. Bei L- und D-Cystin sowie L- und D-Homocystin wurde zusätzlich der Ketogruppengehalt nach 2.2.10.1 aus obigem Enzymansatz bestimmt.
Die Werte wurden mit dem $\epsilon_{520\ nm}$ von 2,56 x 10^6 cm^2 x mol^{-1} für Pyruvat berechnet.

Mit DTE ist der Umsatz mit L-Cystein um den Faktor 2,6 erhöht. Cyanid kann sowohl durch Sulfit oder Thiocyanat z.T. ersetzt werden, wobei Cysteinsäure oder Thiocyanoalanin entstehen sollten. Bei pH 7,5 findet allerdings keine Reaktion mit Thiocyanat statt. Bei den Disulfiden wurde parallel das Auftreten von den entsprechenden Ketogruppen (Tab. 39) und die Thiocyanatbildung (Tab. 40) bestimmt. Die Raten der Thiocyanatbildung (Tab. 40) sind höher als die der Ketogruppen und des Schwefelwasserstoffes (Tab. 39). Dabei ist aber zu beachten, daß die Eisenkomplexe der Thiocyanatbildung (Tab. 40) andersartige Absorptionsmaxima besitzen, so daß nicht mit letzter Sicherheit Thiocyanat als Reaktionsprodukt angenommen werden kann. Auf diese Ergebnisse wird in der Diskussion 3.7.5.1 näher eingegangen.

Tab. 40 : Freisetzung von Thiocyanat aus Disulfiden durch die ß-Cyanoalanin-synthetase

Substrat	- DTE		+ DTE	
	Thiocyanat	λ_{max}	Thiocyanat	λ_{max}
L-Cystin	14,1 nmol	389 nm	21,5 nmol	434 nm
L-Homocystin	25,0 nmol	434 nm	27,6 nmol	434 nm
Glutathion ox.	24,8 nmol	432 nm	27,9 nmol	436 nm

Der Versuchsansatz enthielt in 1 ml Endvolumen 100 µmol Tris-freie Base ; 2 µmol DTE, wo angegeben; 1 µmol Cyanid; 0,8 µmol Substrat und das angereicherte Enzym (Abb. 38 ; 71,2 µg Protein). Zu jedem Substrat wurde ein Nullwert ohne Enzym und ein Eichwert mit 1 µmol Thiocyanat angesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Ansätze nach 2.2.6 behandelt und bei 460 nm gemessen. Wegen der abweichenden Absorptionsmaxima sind diese angegeben.

3.7.2.5.4 Substratspezifität der Austauschreaktion

Das angereicherte Enzym besitzt auch Austauschaktivitäten (Tab. 41), da Cystein aus S-Methyl-L- und S-Äthyl-L-Cystein und Schwefelwasserstoff gebildet werden kann. Cysteinsäure ist kein Substrat.

Tab. 41 : Substratspezifität der Austauschreaktion

Substrat	Cystein
S-Methyl-L-Cystein	27,0 nmol
S-Äthyl-L-Cystein	7,6 nmol
L-Cysteinsäure	1,0 nmol

Die Versuche wurden nach 2.5.1 durchgeführt, wobei statt O-Acetyl-L-Serin die genannten Verbindungen als Acceptoren des Schwefelwasserstoffes gelten. Der Ansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 100 µmol Tris-HCl pH 7,5 ; 2 µmol DTE ; 5 µmol Natriumsulfid ; 5 µmol Substrat und angereichertes Enzym (Abb. 38 , 89 µg Protein). Es wurde stets ein Eichwert für jedes Substrat gemessen.

3.7.2.6 Der Einfluß von Pyridoxalphosphat und seiner Hemmstoffe

Der Zusatz von Pyridoxalphosphat führt nur bei der D-Cysteindesulfhydrase zu einer merklichen Steigerung um das dreifache, während bei der Cysteinsynthase, L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthetase eher eine Hemmung beobachtet wurde (Tab.42).

Tab. 42 : Einfluß von Pyridoxalphosphat und seiner Hemmstoffe

Hemmstoff		a) Cysteinsynthase ohne Pyridoxalphosphat Cystein (nmol)	%	mit Pyridoxalphosphat Cystein (nmol)	%	b) L-Cysteindesulfhydrase ohne Pyridoxalphosphat H_2S (nmol)	%	mit Pyridoxalphosphat H_2S (nmol)	%
-		865,5	100 %	781,7	100 %	20,2	100 %	17,9	100 %
Hydroxylamin	0,5 mM	767,5	89 %	790,5	101 %	7,4	37 %	12,8	72 %
	5,0 mM	610,8	71 %	678,7	87 %	6,5	32 %	5,6	31 %
Aminooxy-essigsäure	0,5 mM	126,2	15 %	247,5	32 %	6,1	31 %	13,3	75 %
	5,0 mM	150,4	17 %	174,2	22 %	4,7	24 %	8,9	50 %
Cycloserin	0,5 mM	853,4	99 %	648,4	84 %	11,1	55 %	15,3	86 %
	5,0 mM	814,0	94 %	555,4	71 %	8,5	42 %	10,2	57 %

		c) ß-Cyanoalaninsynthetase ohne Pyridoxalphosphat H_2S (nmol)	%	mit Pyridoxalphosphat H_2S (nmol)	%	d) D-Cysteindesulfhydrase ohne Pyridoxalphosphat H_2S (nmol)	%	mit Pyridoxalphosphat H_2S (nmol)	%
-		22,1	100 %	18,5	100 %	112,4	100 %	353,3	100 %
Hydroxylamin	0,5 mM	16,5	74 5	14,5	66 %	21,4	19 %	27,9	8 %
	5,0 mM	8,1	37 %	8,5	46 %	18,9	17 %	63,1	18 %
Aminooxy-essigsäure	0,5 mM	8,7	40 %	13,0	71 %	30,1	27 %	54,2	15 %
	5,0 mM	10,4	47 %	3,2	17 %	21,3	19 %	77,3	22 %
Cycloserin	0,5 mM	19,5	88 %	11,9	65 %	167,2	148 %	210,7	60 %
	5,0 mM	11,6	53 %	14,1	76 %	56,8	51 %	241,9	68 %

Für diesen Versuchsteil wurden alle Reagenzien in 20 mM Phosphatpuffer entsprechenden pH-Wertes gelöst, wie auch die Enzymfraktionen gegen den Phosphatpuffer pH 8,0 dialysiert wurden.
Proben, die Pyridoxalphosphat enthielten, wurden 5 Minuten ohne das sonst zuletzt zugegebene Substrat mit Pyridoxalphosphat vorinkubiert, bevor die eigentliche Enzymreaktion durch Zugabe dieses Substrates gestartet wurde. Bei alleiniger Zugabe eines Hemmstoffes wurde in gleicher Weise verfahren. Enthielt der Ansatz Pyridoxalphosphat und einen Hemmstoff, so wurde zuerst 5 Minuten mit dem Pyridoxalphosphat vorinkubiert, dann das Substrat zugegeben und nach weiteren 5 Minuten der Hemmstoff zugesetzt, womit die Enzymreaktion gestartet wurde. Zu jedem Ansatz bestimmte man parallel einen Eichwert mit Cystein a) oder Schwefelwasserstoff b), c), oder d) mit dem die Enzymwerte umgerechnet wurden. Alle Enzymteste inkubierte man, wo angegeben, mit 0,1 mM Pyridoxalphosphat und/oder 0,5 mM bzw. 5 mM Hemmstoff.
Für die Enzymteste a) - c) wurde die angereicherte Enzymfraktion (Abb. 38 , 89 µg Protein) und für d) eine weiter gereinigte Enzymfraktion (siehe 3.7.3.2 , 120 µg Protein) verwendet.

a) Cysteinsynthase : Test nach 2.5.1 b) L-Cysteindesulfhydrase : Test nach 2.5.3.1
c) ß-Cyanoalaninsynthetase : Test nach 2.5.8 d) D-Cysteindesulfhydrase : Test nach 2.5.3.2

Hydroxylamin und Aminooxyessigsäure sind bei der D-Cysteindesulfhydrase gute Hemmstoffe, deren Wirkung auch durch Pyridoxalphosphat nicht verhindert werden kann. Cycloserin ist ohne großen Einfluß.
Die Cysteinsynthase kann am besten durch Aminooxyessigsäure gehemmt werden, während Hydroxylamin und Cycloserin ohne große Wirkung sind. Die L-Cysteindesulfhydrase wird von Hydroxylamin und Aminooxyessigsäure in geringerem Maße aber gleicher Weise gehemmt, wohingegen Cycloserin nur mäßigen Einfluß hat. Die ß-Cyanoalaninsynthetase wird nur von Aminooxyessigsäure richtig gehemmt. Allgemein fällt auf, daß Pyridoxalphosphatzusatz die Wirkung der Hemmstoffe lindert.

3.7.3 Reaktionsproduktanalyse

3.7.3.1 Reaktionsprodukte der Cysteinsynthase

Nachdem nun die Eigenschaften der Cysteinsynthase untersucht worden waren, galt es,das Reaktionsprodukt des Enzyms nachzuweisen. Dazu setzte man die unter 3.7.1 gereinigte Cysteinsynthase (178 µg Protein) in den Cysteinsynthase-Test 2.5.1 ein, dessen Sulfid- und O-Acetyl-L-Seringehalt auf jeweils 10 mM erhöht worden war. Nach Reaktionsende erhitzte man den Ansatz 5 Minuten in kochendem Wasserbad,um anschließend das denaturierte Protein abzuzentrifugieren. Den Überstand gab man auf die Trisacryl-GF05-Säule (2.3.3). Es traten zwei Gaitonde-positive Fraktionen auf, die bei 57 ml (8 %) und 91 ml (92 %) eluiert worden waren. Während die erste Fraktion ein Thiazolidinderivat darstellen dürfte (siehe 3.6.1), handelt es sich bei der zweiten Fraktion um Cystein. Somit wird bei der Cysteinsynthase aus Schwefelwasserstoff und O-Acetyl-L-Serin Cystein gebildet.

3.7.3.2 Stereospezifität der Cysteinsynthase

Als nächstes galt es die Konfiguration des gebildeten Cysteins zu ermitteln. Dazu untersucht man je 400 ml des Enzymansatzes von 3.7.1 bzw. der Cysteinspitzenfraktion (91 ml) der Trisacryl-GF05-Säule mit der L-und D-Cysteindesulfhydrase (2.5.3.1 und 2.5.3.2). Hierbei setzte man als L-Cysteindesulfhydrase die gereinigte Cysteinsynthase von 3.7.1 (178 µg Protein , Abb. 38 , 8,9 % D-Cysteindesulfhydrase-Fremdaktivität) und als D-Cysteindesulfhydrase die Enzymfraktion (120 µg Protein, 7,5 % L-Cysteindesulfhydrase-Fremdaktivität)ein, die nach der DEAE-Sephacel-Säule (Abb. 37) von der L-Cysteindesulfhydrase abgetrennt werden konnte und erneut auf der gleichen Säule nachgereinigt worden war. Die Enzymumsätze, gemessen als Schwefelwasserstoff, wurden um die

jeweilige Fremdaktivität korrigiert.
Auf 1 ml Enzymansatz (3.7.1) ergab sich für den erhitzten Enzymansatz 3,275 µmol L-Cystein (87,5 %) und 470 nmol D-Cystein (12,5 %) und für die Trisacryl-GF05-Säulen-Spitzenfraktion 1,424 µmol L-Cystein (81,7 %) und 320 nmol D-Cystein (18,3 %). Somit ist die Cysteinsynthase für L-Cystein spezifisch, was schon die Versuche zur Substratspezifität mit O-Acetyl-L-Serin und O-Acetyl-D-Serin andeuteten (Tab. 35).

3.7.4 Untersuchungen zur "S-Sulfocysteinsynthase"

3.7.4.1 Versuche zum Nachweis der "S-Sulfocysteinsynthase"

Bei der Aufreinigung der Cysteinsynthase wurde die "S-Sulfocysteinsynthase" auf der Sephadex-G-50-Säule deutlich von der Cysteinsynthase abgetrennt (Abb. 35), zeigte aber gleiches Elutionsverhalten wie die Thiosulfatreduktase. Nach der Trennung an der DEAE-Sephacel-Säule (Abb. 37) konnte die "S-Sulfocysteinsynthase" nicht mehr gefunden werden. Dieses Verhalten ließ sich nur dahingehend interpretieren, daß bei diesem Reinigungsschritt ein Cofaktor abgetrennt worden war, der zur Enzymaktivität nötig war. Deshalb kombinierte man die Spitzenfraktionen der einzelnen Enzyme (Abb. 37), um so Hinweise auf Cofaktoren zu erhalten. Dabei konnte die "S-Sulfocysteinsynthase"-Aktivität durch die Kopplung der Spitzenfraktionen der Cysteinsynthase und Thiosulfatreduktase wieder hergestellt werden. Somit erschien es nötig, eine Produktanalyse dieser Aktivität durchzuführen. Dazu ließ man den Rohextrakt einer Sulfatkultur, der über eine Sephadex-G-50-Säule (2.6.3) gereinigt worden war (Abb. 35 ; Ausschlußpeak 2,07 mg Protein) im "S-Sulfocysteinsynthasetest" 2.5.2 ohne DTE (!) aber bei erhöhtem Thiosulfat (5 mM) und O-Acetyl-L-Serin (10 mM) reagieren und stoppte die Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins wurde der Extrakt auf eine Dowex-50-WX-8-Säule (2.3.4) aufgetragen und eluiert.
Es konnten zwei Gaitonde-positive Substanzen (11 ml und 159 ml, 7/93 %) beobachtet werden. Cystein (89 ml) konnte nicht gefunden werden. Da Sulfocystein schon mit Wasser eluiert wird (3.3.2.3), könnte es sich bei dem vorderen Peak eventuell um Sulfocystein handeln. Mit dem sauren Ninhydrinnachweis (2.2.3.2) konnte kein deutlich positives Gaitonde-Spektrum (Abb. 2) beobachtet werden ($E_{560\ nm} \approx 0{,}04$).
Der Reaktionsansatz durfte kein DTE enthalten, da Sulfocystein als "Buntes Salz" durch DTE (Schema L) sofort zu Cystein und Sulfit gespalten würde. Obwohl diese Ergebnisse das Vorkommen eines eigenen Proteins mit "S-Sulfocystein-

synthase"-Aktivität verneinen, kann dies nicht vollständig ausgeschlossen werden, da eine eindeutige Identifikation des"S-Sulfocysteins" mit der Dünnschichtelektrophorese (2.3.2 , Tab. 16) wegen der geringen Menge nicht möglich war.

3.7.4.2 Kopplung von Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase

Wie die zuvor genannten Versuche andeuten, dürfte es sich bei der "S-Sulfocysteinsynthase" um die Kopplung von Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase handeln, die im Folgenden näher untersucht wird.

In Vorversuchen mit Rohextrakten von Sulfatkulturen, konnte gezeigt werden, daß sowohl Chlorella und auch Synechococcus (7 % von Chlorella) im S-Sulfocysteinsynthase-Test positive Ergebnisse liefern. Bei Chlorella waren Dithiole (DTE 100 %, BAL 124 %) effektiver als Monothiole (Glutathion reduziert 63 %, Mercaptoäthanol 43 %), wobei Dithioerythrit gleiche Ergebnisse wie Dithiothreitol liefert. Für diese Reaktionskette war nur O-Acetylserin und nicht N-Acetylserin und Serin geeignet.

Kopplungsversuche mit teilgereinigter Cysteinsynthase und Thiosulfatreduktase ergaben, daß bei der Kopplung mit O-Acetylserin als Akzeptor kein freier Schwefelwasserstoff, mit Phosphoserin als Akzeptor eine Abnahme des freien Schwefelwasserstoffs um 8 % beobachtet wurde, wobei hier DTE und Mercaptoäthanol gleich wirksam waren. Der Umsatz mit Phosphoserin betrug für die Cysteinsynthase allein nur 0,5 %.

Die Kopplung wurde mit stark gereingigten Enzymen durchgeführt (Tab. 43). Dabei verwendete man die Cysteinsynthase, die unter 3.7.1 aufgereinigt und unter 3.7.2 näher charakterisiert wurde (Tab. 34) und die Thiosulfatreduktase II mit einem Molekulargewicht von 26 500 (SCHMIDT et al. 1984).

In Tab. 43 sind alle Ergebnisse zusammengefaßt, wobei die Enzymwerte schon um alle Nullwerte korrigiert und mit den Eichwerten umgerechnet wurden. Dabei galt es die Menge an gebildetem Cystein wie auch die des Schwefelwasserstoffes zu bestimmen. Die Versuchsergebnisse mußten wegen des erheblich größeren negativen Einflusses von Thiosulfat als Schwefelwasserstoff auf den Cysteinnachweis (Abb. 17) gegen zwei Nullwerte (A_o, B_o) gemessen und mit den entsprechenden Eichwerten (A_E, B_E) für die Cysteinsynthase umgerechnet werden. Um bei den einzelnen Enzymansätzen den jeweiligen Null- und Eichwert deutlich zu machen, tragen die einzelnen Ansätze die zugehörigen Buchstaben. Alle Nullwerte bezüglich der Cysteinbestimmung waren stets negativ, während die der Schwefelwasserstoffbestimmung für die S-Sulfocysteinbildung der Cysteinsynthase 14 nmol (C7), für die Thiosulfatreduktase 17,5 nmol (C15) und für die Kopplung 14 nmol (C21) und für den Einfluß der Cysteinsynthase auf die Thiosulfatreduktase 8 nmol (C33) ergaben.

Tab. 43 : Kopplung von Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase

Substanz	Reaktionsansatznummer															
	A_0	B_0	A_E	B_E	C_0	C_E	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	C_7	C_8	B_{13}	A_{14}
Tris	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
DTE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Na_2S	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-		-
$Na_2S_2O_3$	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
OAS	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
L-Cystein	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	-	100	100	50	25	10	5	100	100	100	100
TSR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cystein (nmol)	N	N	E	E	/	/	N	215	92	55	41	37	/	/	N	
H_2S (nmol)	/	/	/	/	N	E	/	/	/	/	/	/	N	44	/	/

	C_{15}	C_{16}	A_{17}	A_{18}	B_{19}	B_{20}	B/C_{21}	B/C_{22}	B/C_{23}	B/C_{24}	B/C_{25}	B/C_{26}	A_{27}	A_{28}	A_{29}	A_{30}
Tris	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DTE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Na_2S	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
$Na_2S_2O_3$	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
OAS	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
L-Cystein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	100	100	100	100	50	25	10	5	100	100	100	100
TSR	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	20	10
Cystein (nmol)	/	/	N	0	N	0	N	49	29	19	14	9	N	275	205	208
H_2S (nmol)	N	134	/	/	/	/	N	23	41	62	66	132	/	/	/	

	A_{31}	A_{32}	C_{33}	C_{34}	C_{35}	C_{36}	C_{37}	C_{38}
Tris	+	+	+	+	+	+	+	+
DTE	+	+	+	+	+	+	+	+
Na_2S	+	+	-	-	-	-	-	-
$Na_2S_2O_3$	-	-	+	+	+	+	+	+
OAS	+	+	-	-	-	-	-	-
L-Cystein	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	100	100	100	100	50	25	10	5
TSR	5	2	30	30	30	30	30	30
Cystein (nmol)	192	186	/	/	/	/	/	/
H_2S (nmol)	/	/	N	142	171	175	190	160

+ = Zugabe der weiter unten angegebenen Substanzmenge
- = keine Zugabe der Substanz
N = Nullwert
E = Eichwert
/ = nicht gemessen

Bei der Kopplung dieser Enzyme wurde entweder der Cysteingehalt oder die Menge an gebildetem Schwefelwasserstoff ermittelt. Dies geschah in den folgenden Versuchsansätzen bei einem Endvolumen von 1 ml, denen, wo angegeben, 100 µmol Tris-HCl pH 7,5 ; 2 µmol DTE ; 5 µmol Na_2S ; 2 µmol $Na_2S_2O_3$; 0,1 µmol Cystein ; 5 µmol O-Acetyl-L-Serin ; Cysteinsynthase (Abb. 38 , 100 µl = 17,8 µg Protein) und Thiosulfatreduktase (SCHMIDT et al.1984, Isoenzym II, 30 µl = 10,7 µg Protein) zugesetzt wurde. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert und entweder mit dem Gaitonde-Reagenz (2.2.3.2) oder den Schwefelwasserstoffreagentien (2.2.5) versetzt und in der dort beschriebenen Weise bestimmt.

In den Testen A_{1-7} , $C_{7/8}$ und $B_{13/14}$ wurden die Eigenschaften der Cysteinsynthase, in den Testen $C_{15/16}$, $A_{17/18}$ und $B_{19/20}$ die der Thiosulfatreduktase bestimmt. In den Testen B_{21-26} bzw. C_{21-26} wurde die Kopplung beider Enzyme, in den Testen A_{27-32} der Einfluß der Thiosulfatreduktase auf die Cysteinsynthase, in den Testen C_{33-38} der Einfluß der Cysteinsynthase auf die Thiosulfatreduktase, gemessen.

Zuerst galt es die Reinheit der eingesetzten Enzyme zu klären. Die Cysteinsynthase (Abb. 38) enthält neben der Cysteinsynthase (100 %, A_{1-6}) auch noch etwas Thiosulfatreduktase (15 % von CS, $C_{7/8}$), bei der es sich um die TSR IIIa (SCHMIDT et al. 1984) handeln dürfte und folgerichtig auch S-Sulfocysteinsynthase (3,2 % , $B_{13/14}$). Die Thiosulfatreduktase enthält nur ihre eigentliche Aktivität ($C_{15/16}$) und keine Cysteinsynthase ($C_{17/18}$) bzw. S-Sulfocysteinsynthase ($C_{19/20}$) mehr.
Wie aus den Kopplungsversuchen (B_{21-26} für die Cysteinbildung und C_{21-26} für die Schwefelwasserstoffbildung) hervorgeht, wird Cystein aus Thiosulfat und O-Acetyl-L-Serin mit der Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase gebildet. So tritt zum einen eine Senkung des Cysteingehaltes, zum anderen in reziproker Weise eine Erhöhung des Schwefelwasserstoffgehaltes ein.
Für diese Reaktion liegt die Cysteinsynthase in ausreichender Menge vor, wie aus Kontrollmessungen (A_{1-6}) hervorgeht, die einen 4-fachen Umsatz gegenüber den Kopplungsversuchen (A_{21-26}) aufweisen. So scheint die Thiosulfatreduktase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein. Da die Kopplung keine gleichgroße Ab- bzw. Zunahme der End- bzw. Zwischenprodukte ergab. liegt der Verdacht nahe, daß ein Teil des gebildeten Schwefelwasserstoffes an die Enzyme gebunden bleibt und somit der Cysteinsynthase entzogen wird.
Aus diesem Grund wurden beide Enzyme mit ihren in vitro Substraten in Gegenwart des anderen Enzyms ohne dessen Substrat gemessen (A_{27-32} bzw. C_{33-38}). Überraschenderweise tritt eine Wechselwirkung zwischen beiden Enzymen auf, die bei steigender Thiosulfatreduktase-Menge zu erhöhtem Cystein führt. Bei der Thiosulfatreduktase selbst führt der steigende Zusatz von Cysteinsynthase zu einer Schwefelwasserstoffabnahme, wobei aber stets höhere Schwefelwasserstoffmengen als für die Thiosulfatreduktase alleine beobachtet werden. Der Grund dürfte im Thiosulfatreduktasegehalt der Cysteinsynthase liegen. Ersetzt man den Akzeptor O-Acetyl-L-Serin durch Phosphoserin, so konnte keine Cysteinbildung und keine Schwefelwasserstoffreisetzung beobachtet werden. Ersetzte man DTE durch Mercaptoäthanol, so konnte in diesem Versuchssystem (Tab. 43) ebenfalls keine Kopplung gemessen werden.

3.7.5 Diskussion

In diesem Abschnitt wurde die Cysteinsynthase näher untersucht. In der Literatur finden sich mehrere Namen für dieses Enzym, das die Bildung von Cystein aus Sulfid und O-Acetyl-L-Serin z.B. durchführt. Neben dem in der vorliegenden Arbeit stets verwendeten Trivialnamen Cysteinsynthase, sind auch O-Acetylserinsulfhydrolase oder O-Acetylserinsulfhydrylase gebräuchlich.

Die Cysteinsynthetase darf dagegen nicht mit der Cysteinsynthase verwechselt werden, da sie ein Enzymkomplex von Serintransacetylase und Cysteinsynthase darstellt, der bisher aber nur bei Bakterien (BECKER und TOMKIN 1966) nachgewiesen wurde. Auf die Bezeichnung O-Acetylserinsulfhydrase wurde bewußt verzichtet, da bisher nicht ausgeschlossen werden kann, daß in vivo unter den pH-Bedingungen des Chloroplasten nicht O-Acetylserin, sondern Phosphoserin das eigentliche Substrat des Enzyms ist.

3.7.5.1 Eigenschaften der untersuchten Enzyme

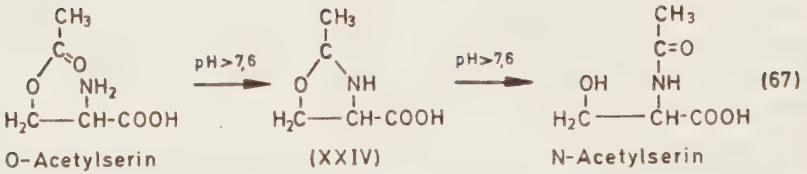
Das Hauptinteresse galt der Cysteinsynthase, deren Aufreinigung nicht vollständig erfolgte. Dies lag z.T. daran, daß bei der Affinitätschromatographie an Affigel-Blue-A (3.7.1.2.4) stets erhebliche Aktivitätsverluste (90 %) auftraten. Auch die präparative trägerfreie Elektrofokussierung mit einem Saccharosegradienten war wenig geeignet, da der Zucker beim Cysteinnachweis bereits nach 5 Minuten karamelisierte und somit als braune Suspension den roten Gaitonde-Komplex überlagerte. Aus diesem Grunde wurde auf eine weitere Aufreinigung nach der zweiten Sephadex-G-50-Säule verzichtet.
Betrachtet man die Übersichtstabelle 34 bezüglich der Aufreinigungsschritte, so fällt auf, daß die Enzymaktivität nach der Ammoniumsulfatfällung drastisch abnimmt, was auf den negativen Einfluß des Ammoniumions zurückzuführen ist (3.7.1.2). Dieses Phänomen wurde auch bei Phaseolus vulgaris in der Fraktion 40 - 90 % für die Cysteinsynthase beobachtet, wobei eine Hemmung von 39 % auftritt. Die gleiche Enzymfraktion von Phaseolus polyanthus wurde dagegen kaum gehemmt (6 %, BERTAGNOLLI und WEDDING 1977).
Das Auftreten von mehreren Cysteinsynthasen auf der Affi-Säule (Abb. 35) gibt Hinweise auf das Vorkommen von Isoenzymen der Cysteinsynthase, wie dies schon von Bakterien wie Salmonella (BECKER und TOMKIN 1966, HULANICKA et al. 1979) und Pilzen, wie Aspergillus (BAL et al. 1975) oder Cephalosporium (DÖBELI und NUESCH 1980) beobachtet wurde. Auch Chromatium vinosum (HENSEL und TRÜPER 1981) und Synechococcus 6301 (DIESSNER und SCHMIDT 1981) scheinen zwei Isoenzyme zu besitzen, wobei dies bei Synechococcus 6301 auf der DEAE-Sephacel-Säule gefunden wurde. Dies beobachtete man auch für Klee, Erbse (NG und ANDERSON 1978a) und Raps (MASADA et al. 1975), wobei letztere Cysteinsynthasen mit Pyridoxalphosphatzugabe nur eine Enzymaktivität zeigten. NGO und SHARGOOL (1974) nehmen eine Funktionsteilung durch Isoenzyme an, wobei eine Cysteinsynthase für die Thioglucosidbiosynthese, die andere Cysteinsynthase bei der Cysteinbildung für Proteine nötig ist. Auch beim Spinat wurden zwei Isoenzyme gefunden (GIOVANNELLI und MUDD 1968, FANKHAUSER et al. 1976), von denen eine im Chloroplasten, die

andere cytoplastidär sein soll (FANKHAUSER und BRUNOLD 1979),auf deren Funktion unter 4.2 näher eingegangen werden soll. Bei Phaseolus vulgaris und Phaseolus polyanthus wurden sowohl zwei Isoenzyme (BERTAGNOLLI und WEDDING 1977), drei Isoenzyme (WYSS und BRUNOLD 1980) wie auch vier Isoenzyme bei Phaseolus vulgaris (SCHMUTZ 1980) beobachtet, wobei eine Cysteinsynthase stets im Chloroplasten lokalisiert ist.

Es sei noch erwähnt, daß die Cysteinsynthase beim Wachstum auf Cysteinäthylester mit dem dabei auftretenden elementaren Schwefel einen Komplex zu bilden scheint, der zu dem verzögerten Elutionsverhalten auf der Sephadex-G-50-Säule (Abb. 36) führt, da in diesem Bereich auch das gebundene Sulfid eluiert wird.

Der pI-Wert der aufgereinigten Cysteinsynthase (Abb. 38) lag, gemessen an eine Chromatofocussing-Säule (GAMON 1983), bei Chlorella bei 5,96 (SCHMIDT und ERDLE 1983; SCHMIDT et al. 1984), während bisher nur Werte von 5,0 bei Enterobacter (YANASE et al. 1982b), 4,1 für Saccharomyces (YAMAGATA 1981) und 4,0 für Gerste (ROSICHAN et al. 1983) beobachtet wurden. Dabei verlor die Cysteinsynthase der Gerste über 90 % ihrer Aktivität, da sie in dem sauren Milieu des pI sehr wenig stabil ist (20 %). Dieser starke Aktivitätsverlust trat auch bei Chlorella auf, so daß die pI-Werte der L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthetase wegen der schon unter Normalbedingungen erheblich niedrigeren Aktivitäten nicht mehr bestimmt werden konnten.

Das pH-Optimum der Cysteinsynthase (Abb. 44) ist vom Puffer sehr stark abhängig. In Phosphatpuffer soll das Holoenzym labiler als in Trispuffer sein (BERTAGNOLLI und WEDDING 1977), so daß man diesen Puffer für die Untersuchungen wählte, zumal Phosphationen auch negative Einflüsse haben können. Das Verhalten der Cysteinsynthase ist von den Eigenschaften seiner Substrate abhängig. Schwefelwasserstoff liegt im sauren Milieu bis pH 6,99 undissoziiert vor und kann somit leicht entweichen. Zwischen 6,99 - 12,91 dissoziiert es zum Hydrogensulfid (HS^-), dem eigentlichen Substrat des Enzyms. Über pH 12,9 liegt es als Sulfidion (S^{2-}) vor. Bei pH 7,4 nahe unseres pH-Wertes von pH 7,5 , liegen 25 % undissoziiert und 75 % als Hydrogensulfid vor (HENSEL 1979). Während daher hohe pH-Werte wünschenswert wären, die zudem der in vivo-Situation im Chloroplasten, dem Syntheseort des Cysteins (4.2), recht nahe kämen, steht dem die hohe Labilität des O-Acetylserins entgegen. Diese Verbindung erfährt ab pH 7,6 eine 1,3-Acylwanderung zum N-Acetylserin (67), wobei eine cyclische Zwischenstufe (XXIV) auftritt. Dabei spielen sterische und induktive Effekte der Aminogruppe (WIELAND und HORNIG 1956) und der Abstand zwischen der Hydroxyl- und der Aminogruppe



eine wichtige Rolle (GROB und WAGNER 1955). Die relative Elektrophilie der in Konkurrenz stehenden Acylgruppen ist auch von Bedeutung (GROB und WAGNER 1955). Eine Temperaturerhöhung beschleunigt die Acylwanderung, die ab pH 7,6 eintritt (KREDICH und TOMKIN 1966; MASADA et al. 1975). Die Reaktion geschieht in einer Reaktion pseudo- 1. Ordnung (FLAVIN und SLAUGHTER 1965). Bei pH 7,5 beträgt die Rate der Acylwanderung nur 0,098 , während sie bei pH 8,5 bei 0,23 liegt (FLAVIN und SLAUGHTER 1965). In Tris-Puffer scheint dieser Vorgang gegenüber Phosphatpuffer beschleunigt zu sein (YAMAGATA et al. 1974), so daß bei Trifolium eine Abnahme um 40 % beobachtet wurde (NG und ANDERSON 1978a). Dies kann durch das pH-Verhalten aus Abb. 44 bestätigt werden, wo die Schwefelwasserstoffmenge stetig zu- und die O-Acetylserinmenge ab pH 8,0 stark abnimmt, wie dies durch das Verschwinden der freien Aminogruppe, die man im neutralen Ninhydrinnachweis (2.2.2.1) erfaßt, gezeigt wird.

Die Cysteinsynthase zeigt bei Chlorella (Abb. 44) ein pH-Optimum von 7,0 während es sonst bei 7,5 liegt, wie dies für Chromatium (HENSEL und TRÜPER 1976), Synechococcus (DIESSNER und SCHMIDT 1981), Spinat (SCHMIDT 1977a), Astragalus, Pisum und bei Trifolium im Trispuffer, aber im Phosphatpuffer bei 7,8 (NG und ANDERSON 1978a) liegt. Die Cysteinsynthasen von Phaseolus vulgaris und Phaseolus polyanthus haben ein breites Maximum von pH 7,5 - 8,5 (SMITH und THOMPSON 1971). Bei Gerste liegt es bei pH 8,0 (ROSICHAN et al. 1983). Enterobacter soll ein Maximum bei pH 10,0 haben, was aber wegen der Acylwanderung wenig wahrscheinlich erscheint (YANASE et al. 1982b). Verwendet man dagegen Phosphoserin als Akzeptor, so sollte das pH-Optimum stärker alkalisch sein, da hier keine Acylwanderung auftreten kann.

Die Zeitabhängigkeit ist bei Chlorella in den ersten 20 Minuten (Abb. 45) wie auch bei Raps (NGO und SHARGOOL 1973) linear, um dann kaum erhöhte Umsätze zu zeigen, wohingegen SCHMIDT (1977b) bei Chlorella ebenso wie bei Synechococcus (DIESSNER und SCHMIDT 1981) eine stete Zunahme bis zu einer Stunde beobachtete. Nur Spinat erreicht nach 30 Minuten ein Plateau (SCHMIDT 1977a).

Beim Vergleich der eigenen K_m-Daten (Abb. 46 - 50) mit denen der Literatur (Tab. 44), fällt auf, daß große Unterschiede zwischen den Untersuchungen mehrerer Autoren bei dem gleichen Organismus bestehen. Grund dafür dürften die unterschiedlichen Meßmethoden sein, die verschiedene Empfindlichkeiten

Tab. 44 : K_m-Werte der Cysteinsynthase

Organismus	Organ	Meß-methoden	K_m OAS (mM) (K_I mM)	K_m H_2S (mM) (K_I mM)	Autoren
Salmonella typhimurium	-	H_2S-E	0,15 (49,9)	0,066 (0,013)	COOK und WEDDING 1976/1977a
		NO_2-N	2,1 (27,6)	n.g.	COOK und WEDDING 1977b
		NO_2-N	0,7	n.g.	ROSICHAN et al. 1983
		NO_2-N	5	0,1	BECKER et al. 1969
		NO_2-N			BECKER und TOMKIN 1966
		NO_2-N	7	n.g.	KREDICH 1971
Enterobacter SP 10-1	-	NO_2-N	8,3	0,5	YANASE et al. 1982b
Pseudomonas aerogines	-	Gai-R	n.g.	0,15 / 0,05	CHAMBERS und TRUDINGER 1975
Cephalosporium acremonium	-	Gai-R	18	n.g.	DOBELI und NUESCH 1980
Hefe	-	n.b.	0,018/5,12	n.g.	YAMAGATA et al. 1974/1975
Chromatium vinosum	-	Gai-R	I 1,0 II 15	I 0,4 II 1,6	HENSEL und TRÜPER 1981
Rhodospirillum tenue	-	Gai-R	I 2,9 II 50	I 0,6 II 0,6	HENSEL und TRÜPER 1983
Synechococcus 6301	-	Gai-R	I 0,6 II 0,8	I 0,8 II 0,8	DIESSNER und SCHMIDT 1981
Chlorella fusca	-	Gai-R	5,8	1,4	s. Abb. 46 und Abb. 47
		Gai-R	1,1	2	SCHMIDT 1977b
Weizen	Blatt	Gai-R	0,037	0,59	ASCANO und NICHOLAS 1977
Gerste		NO_2-N	8,2	6,7	ROSICHAN et al. 1983
Brassica chinensis	Blatt	NP-Na	6,1	n.g.	MASADA et al. 1975
Brassica napus	Saft	H_2S-E	0,0017	0,43	NGO und SHARGOOL 1973
Pisum sativum		Gai-R	3,1	0,24	NG und ANDERSON 1978a
		H_2S-E	0,24	0,06	NG und ANDERSON 1978a
Rettich	Wurzel	Gai-R	2,17	n.g.	TAMURA et al. 1976
Klee	Blatt	Gai-R	3,5	0,51	NG und ANDERSON 1978a
		H_2S-E	2,0	0,13	NG und ANDERSON 1978a
Astragalus hamosus	Blatt	Gai-R	4 - 6,5	0,15 - 0,21	NG und ANDERSON 1978b
Phaseolus vulgaris	Blatt	H_2S-E	A 3,8 B 2,3	A 0,28 B 0,3	BERTAGNOLLI und WEDDING 1977
Phaseolus polyanthus	Blatt	H_2S-E	A 0,75 B 3,9	A 0,18 B 0,28	BERTAGNOLLI und WEDDING 1977
Spinat	Blatt	Gai-R	4,3	0,6	SCHMIDT 1977a

Abkürzungen : H_2S-E = H_2S-Elektrode; NO_2-N = Nachweis nach KREDICH und BECKER (1971) als Nitrit
Gai-R = Gaitonde-Reagenz (GAITONDE 1967); n.b. = nicht bekannt
NP-Na = Nitoprussidnatrium-Nachweis (VACHECK 1960)
A = Isoenzym A; B = Isoenzym B; I = Isoenzym I; II = Isoenzym II

besitzen. Die H_2S-Elektrode ist den spektralphotometrischen und colorimetrischen Methoden, zu denen auch der Gaitonde-Nachweis gehört,überlegen, aber störanfälliger und zeitraubender. Wie aus Tab. 44 hervorgeht, weichen die eigenen K_m-Werte etwas von den bisher bekannten für Chlorella ab (SCHMIDT 1977b).
Eine kompetitive Endprodukthemmung der Cysteinsynthase wurde für L-Cystein beobachtet (K_I = 0,048 mM, Abb. 46). Die Bestimmung der K_I-Werte erfolgte auf rechnerischem Wege aus den Daten der Abb. 46 . Dies war auch von Salmonella (K_I = 1 mM, COOK und WEDDING 1976), Synechococcus (DIESSNER und SCHMIDT 1981) Trifolium (66 % Hemmung, 10 mM, NG und ANDERSON 1978a) und Weizen (K_I 2,3 mM, ASCANO und NICHOLAS 1977) bekannt. Auch O-Acetyl-L-Serin führt zu einer Substrathemmung (Abb. 46), wie dies auch bei Salmonella (46,9 mM, COOK und WEDDING 1976), Gerste (K_I 150 mM, ROSICHAN et al. 1983), Phaseolus vulgaris (B, K_I 69,3 mM) und P. polyanthus (B, 152 mM) beobachtet wurde, wenngleich die letzten Autoren BERTAGNOLLI und WEDDING (1977) keine Hemmung für das jeweilig andere Enzym bei Phaseolus beobachteten.
Schwefelwasserstoff zeigt bei Chlorella (Abb. 47) keine Substrathemmung, wie dies bei Salmonella (K_I 0,013 mM, COOK und WEDDING 1977a; K_I 0,3 mM. COOK und WEDDING 1977b), Weizen (K_I 107 mM, ASCANO und NICHOLAS 1977), Phaseolus vulgaris (A und B, K_I 1 mM) und P. polyanthus (A, K_I 10,1 mM; B, K_I 7,5 mM; BERTAGNOLLI und WEDDING 1977) gefunden wurde.
Die Cysteinsynthase wird auch von O-Acetyl-L-Homoserin nicht kompetitiv bei Cephalosporium (K_I 0,075 mM, DÖBELI und NUESCH 1980) und von L-Homoserin bei Weizen (K_I 1,3 mM, ASCANO und NICHOLAS 1977) gehemmt, die beide keine Substrate sind.
Auch Metabolisierungsprodukte des Cysteins wie L-Methionin hemmen das Enzym kompetitiv bei Weizen (K_I 1,7 mM, ASCANO und NICHOLAS 1977) und bei Hefe (K_I 3,6 mM, YAMAGATA et al. 1975) nicht aber bei Chromatium (HENSEL und TRÜPER 1981),wie auch S-Adenosyl-Methionin bei Cephalosporium (K_I 0,5 mM, DÖBELI und NUESCH 1980) nicht kompetitiv wirkt. Reduziertes Glutathion und Homocystein bleiben bei Chromatium (HENSEL und TRÜPER 1981) und L-Serin, L-Cystin, L-Homoserin und O-Acetyl-L-Homoserin bei Weizen (ASCANO und NICHOLAS 1977) ohne Einfluß.
Bei der Produktanalyse war es notwendig, die Cysteinsynthase nach Inkubationsende zu inaktivieren. Ein Ausfällen des Enzyms mit Trichloressigsäure schied aus, da dieses den Cysteinnachweis mit dem Gaitonde-Reagenz hemmt (MEYER 1957) und somit nur geringe Umsätze vortäuschen würde. Deshalb wurde eine thermische Denaturierung durchgeführt, wenngleich auch hier Cystein zu Schwefelwasserstoff zersetzt wird.

Die Produktanalyse der Cysteinsynthase ergab eindeutig, daß hauptsächlich Cystein gebildet wird. Die Enzymreaktion ist zudem stereospezifisch, da zum einen nur L-Cystein aus O-Acetyl-L-Serin entstand und zum anderen mit O-Acetyl-D-Serin kein Umsatz erzielt werden konnte (Tab. 35). Somit werden die Beobachtungen von FLOSS et al. (1976) bestätigt.

Die Substratspezifität (Tab. 35) zeigt, daß nur O-Acetyl-L-Serin das einzig wirklich verwertbare Substrat ist, während sein D-Stereoisomer fast nicht umgesetzt wird. Trotzdem ist es wenig wahrscheinlich, daß O-Acetyl-L-Serin das in vivo Substrat ist, da es unter den pH-Bedingungen des Chloroplasten, wo die assimilatorische Sulfatreduktion stattfindet (4.2), eine Acylwanderung zu N-Acetyl-L-Serin erfährt, welches weder bei Chlorella (Tab. 35), Spinat (GIOVANELLI und MUDD 1968), RAPS (MASADA et al. 1975), Rettich (TAMURA et al. 1976) und Klee (NG und ANDERSON 1978a) einen Enzymumsatz bewirkt. Daher erscheint Phospho-L-Serin und L-Serin, sein dephosphoryliertes Produkt, ein denkbares in vivo Substrat zu sein, da es im alkalischen Milieu stabil bleibt und bei pH 7,5 0,43 %, bei pH 9,0 aber 1,8 % (bezogen auf O-Acetyl-L-Serin) Umsatz zur Cysteinbildung zeigt (Tab. 38). In gleicher Größenordnung liegen auch die Umsätze von Phosphoserin bei Hefe (0,2 %, THOMPSON und MOORE 1968), Cephalosporium (3 %, DÖBELI und NUESCH 1980), Spinat (0,4 %, GIOVANELLI und MUDD 1968) und Raps (NGO und SHARGOOL 1974), während es bei der Kohlrübe (THOMSON und MOORE 1968) und Klee (NG und ANDERSON 1978a) kein Substrat zu sein scheint.

Obwohl die Acetylgruppe des O-Acetyl-L-Serins eine bessere Abgangsgruppe als die Phosphatgruppe des Serins ist und zudem eine stärker polare Umgebung an der aktiven Stelle des Enzyms erzeugt, reicht der Umsatz mit Phosphoserin (2,7 µM) aus, da in vivo der Pool von gebundenem Sulfid nur 2 µM beträgt (SCHMIDT 1973, SCHMIDT et al. 1974). Freier Schwefelwasserstoff scheint artifiziell zu sein, obwohl er einen höheren K_m-Wert (1,4 mM, Abb. 47) besitzt.

Auch L-Serin ist kein gutes Substrat (1,2 %, Tab. 35 ; 2,6 % bei Chlorella , SCHMIDT 1977b), wie dies auch von Hefe (0,5 %, THOMPSON und MOORE 1968), Cephalosporium (DÖBELI und NUESCH 1980), Raps (6,3 %, NGO und SHARGOOL 1974) und Phaseolus vulgaris (10 %, 0,25 mM, BERTAGNOLLI und WEDDING 1977) bekannt ist. Bei Salmonella (KREDICH und BECKER 1971), Rettich (TAMURA et al. 1976), Klee (NG und ANDERSON 1978a), Spinat (GIOVANELLI und MUDD 1968), Kohlrübe (THOMPSON und MOORE 1968) aber auch Raps, im Widerspruch zu oben (MASADA et al. 1975) wird kein Umsatz mit L-Serin beobachtet. D-Serin stellt bei Chlorella (Tab. 35) und Hefe (0,85 %, THOMPSON und MOORE 1968) ein schlechtes Substrat, wohingegen Kohlrübe keinen Umsatz zeigt (THOMPSON und MOORE 1968). Aber auch

O-Acetyl-L-Homoserin liefert nur bei Raps (4,4 %, NGO und SHARGOOL 1974) bescheidenen Umsatz, während es bei Salmonella (KREDICH und BECKER 1971) Bacillus megaterium (CASTRIC und CONN 1971), Cephalosporium (DÖBELI und NUESCH 1980), Rettich (TAMURA et al. 1976), Klee (NG und Anderson 1978a), Spinat (GIOVANELLI und MUDD 1968), Phaseolus vulgaris (SMITH und THOMPSON 1971) wie auch im Gegensatz zu oben bei Raps (MASADA et al. 1975) kein Substrat ist. O-Acetyl-L-Threonin war bei Salmonella (0,7%, KREDICH und TOMKINS 1966; 0 %, KREDICH und THOMPSON 1971), Hefe (YAMAGATA et al. 1974) und Spinat (GIOVANELLI und MUDD 1968) fast ohne Wirkung, wie dies auch auf O-Succinyl-L-Serin bei Salmonella (KREDICH und BECKER 1971) und O-Oxoyl-L-Serin bei Spinat (GIOVANELLI und MUDD 1968) zutrifft. O-Succinyl-L-Homoserin könnte bei Raps (2,8 %, NGO und SHARGOOL 1974), nicht aber bei Salmonella (KREDICH und BECKER 1971), Bacillus megaterium (CASTRIC und CONN 1971), Hefe (YAMAGATA 1974), Klee (NG und ANDERSON 1978a) und Spinat (GIOVANELLI und MUDD 1968) als Substrat fungieren, wie dies auch für O-Benzyl-L-Serin bei Cephalosporium (DÖBELI und NUESCH 1980) zutrifft. Bei Phaseolus kann O-Propionyl-L-Serin mit gleicher Ausbeute als O-Acetyl-L-Serin eingesetzt werden (BERTAGNOLLI und WEDDING 1977). O-Methyl-Serin (6,3 %) und Methylserinester (4 %) sind bei Raps einsetzbar (NGO und SHARGOOL 1974). L-Homoserin scheint nur bei Raps (4 %, NGO und SHARGOOL 1974), nicht aber bei Spinat (6 %, GIOVANELLI und MUDD 1968) und Klee (NG und ANDERSON 1978a) verwertbar zu sein. L-Cysteinmethylester (KREDICH und BECKER 1971) ist für Salmonella kein Substrat. Raps kann Threonin als Akzeptor verwerten (NGO und SHARGOOL 1974).

Eine Hemmung der Cysteinsynthase wurde neben den bereits beschriebenen Fällen für L-Cystein, O-Acetyl-L-Serin und Schwefelwasserstoff auch S-Sulfocystein bei Chlorella (Tab. 34) und Rhodospirillum (HENSEL und TRÜPER 1983) wie auch für S-Methyl- und S-Äthyl-L-Cystein (Tab. 36) beobachtet. Dagegen ist es etwas überraschend, daß D/L-Homocystein eine Steigerung bewirkt, da Homocystein mit dem Pyridoxalphosphat der Cysteinsynthase ein Thiolacton bildet (ABBOTT und MARTELL 1970) und somit das Enzym hemmen müßte. Bei Klee hemmen Cystathionin (91 %), L-Cystein (66 %), N-Acetyl-L-Serin (20,6 %), L-Homoserin (16 %) und L-Methionin (20,3 %) das Enzym (NG und ANDERSON 1978a).

Als letzte Eigenschaft sei noch das Molekulargewicht erwähnt. Bei bakteriellen Systemen muß stets bedacht werden, daß dort die Cysteinsynthetase aus Serintransacetylase und Cysteinsynthase besteht, die einen Komplex bilden, dessen Molekulargewicht bei Salmonella 309000 D beträgt (COOK und WEDDING 1978). Die Cysteinsynthase hat dabei nur ein MG von 68000 D und besteht aus 2 Unter-

einheiten (BECKER et al. 1969, COOK und WEDDING 1977a), wie dies auch für Enterobacter (YANASE et al. 1982b) gefunden wurde. Nur Saccharomyces besitzt eine Cysteinsynthase mit 96 000 D (YAMAGATA 1980). Das Molekulargewicht der Cysteinsynthase liegt bei Bacillus megaterium zwischen 60 - 70 000 D (CASTRIC und CONN 1971) und bei Phaseolus zwischen 65 - 70 000 D (BERTAGNOLLI und WEDDING 1977). Bei Rettich liegt es bei 66 000 D (TAMURA et al. 1976), bei Spinat bei 64 000 D (SCHMIDT 1977a) oder 57 000 D (eigene Ergebnisse), bei Chlorella bei 63 000 D (SCHMIDT 1977b) oder 68 000 D (Abb. 42), bei Raps bei 62 000 D (MASADA et al. 1975), bei Pseudomonas bei 58 000 (CHAMBERS und TRUDINGER 1971) und bei Rhodospirillum bei 57 000 (HENSEL und TRÜPER 1983). Die Cysteinsynthase I von Chromatium hat ein Molekulargewicht von 56 000 D (HENSEL und TRÜPER 1981), wie es auch für die Cysteinsynthasen von Synechococcus 6301 (DIESSNER und SCHMIDT 1981) beobachtet wurde, während Cephalosporium (DÖBELI und NUESCH 1980) und die Cysteinsynthase II von Chromatium (HENSEL und TRÜPER 1981) 50 000 D beträgt. Bei der Lupine wurde bisher die kleinste Cysteinsynthase mit 41 000 D gefunden (HENRICKSON und CONN 1969).

Als zweites Enzym wurde versucht, die L-Cysteindesulfhydrase anzureichern. Ihr Verhalten war dem der Cysteinsynthase ähnlich, wobei an der DEAE-Sephacel- (Abb. 37) oder DEAE-Biogel-A-Säule (Abb. 40) die D-Cysteindesulfhydrase vollständig abgetrennt werden konnte, wie dies für Chlorella beschrieben wurde (SCHMIDT und ERDLE 1983). Auch dieses Enzym wurde besonders durch Ammoniumionen gehemmt, so daß der starke Abfall der Aktivität nach der Ammoniumsulfatfällung erklärbar ist. Prinzipiell beträgt die spezifische Aktivität nur 0,3 % der Cysteinsynthase, ein Hinweis auf die Seitenaktivität der L-Cysteindesulfhydrase, wie dies unter 3.7.4.2 näher besprochen wird.
Das pH-Optimum scheint bevorzugt im Alkalischen zu liegen, wobei aber die Umrechnung mit einem Schwefelwasserstoffeichwert bei jedem pH-Wert notwendig ist, da Schwefelwasserstoff sich im Alkalischen besser löst. Bei Salmonella liegt das Maximum zwischen pH 8,5 - 9,0 (UREN et al. 1978, KREDICH et al. 1973). Die Reaktion ist die ersten 20 Minuten linear.
Der K_m-Wert bezüglich L-Cystein ist bisher nur von Bakterien bekannt und beträgt bei Salmonella 0,17 - 0,22 mM (UREN et al. 1978, KREDICH et al. 1973) und Enterobacter 0,3 mM (UREN et al. 1978), wobei bei Salmonella ein K_I-Wert von 0,01 mM für Schwefelwasserstoff gemessen wurde (KREDICH et al. 1973). Auch Chlorella hat einen K_m-Wert im gleichen Bereich (0,33 mM, Abb. 48) und wird ab 8 mM L-Cystein, nach Art einer Substrathemmung, negativ beeinflußt.

Die Substratspezifität zeigt, daß nur L-Cystein, nicht aber D-Cystein, bei

Chlorella ein gutes Substrat ist (Tab. 37), wie dies auch für Salmonella beobachtet wurde (KREDICH et al. 1973). Auch die Cysteinester werden z.T. schlechter als L-Cystein umgesetzt. L- und D-Cystin, L- und D-Homocystin, Homocystein und Cysteamin sind bei Chlorella nur schlechte Substrate (Tab. 37), während sie bei Salmonella überhaupt nicht als Substrat fungieren (KREDICH et al. 1977). So ist N-Acetyl-L-Cystein bei Chlorella ein schlechter H_2S-Donor, während bei Salmonella weder L- und D-Serin, O-Acetyl-L-Serin, ß-Cyanoalanin, Lanthionin, Djenkolsäure, Cystathionin, Cysteamin, L-Cysteinsäure und L-Cysteinsulfinsäure nicht umgesetzt werden können (KREDICH et al. 1973). Die Hemmung der L-Cysteindesulfhydrase von Salmonella durch L-Serin (2,0 mM), L-Cystin und D-Cystin (bis 20 %, KREDICH et al. 1973) konnte bei Chlorella nicht bestimmt werden (Tab. 38). Nur O-Acetyl-L-Serin scheint hemmend zu wirken, was Hinweise auf den Reaktionsmechanismus gibt. Das Molekulargewicht der bakteriellen L-Cysteindesulfhydrasen unterscheidet sich deutlich von dem von Chlorella (68 000, Abb. 42). Bei Aerobacter beträgt es 253 000 D (KUMAGAI et al. 1975b) und 230 000 D bei Salmonella (KREDICH et al. 1973) und Enterobacter (UREN et al. 1978). Hier wird schon sichtbar, daß es zwei völlig verschiedene L-Cysteindesulfhydrasen zu geben scheint.

Als drittes Enzym wurde die ß-Cyanoalaninsynthetase untersucht, da dieses Enzym ebenfalls Cystein umsetzt. Ihr Verhalten bei der Aufreinigung gleicht dem der Cysteinsynthase und L-Cysteindesulfhydrase, so daß die angereicherte Enzymfraktion ebbenfalls die ß-Cyanoalaninsynthetase besitzt, die aber nur 0,4 % der Cysteinsynthase ausmacht und somit eine Seitenaktivität der Cysteinsynthase sein kann. Ein Grund für die schlechten Ausbeuten bei der Ammoniumsulfatfällung sind in der Hemmung durch Ammoniumionen zu sehen. Obwohl keine eigenen Ergebnisse vorliegen, soll der pI-Wert kurz erwähnt werden, der bei Enterobacter bei 5,0 (YANASE et al. 1982a) und bei der Lupine bei 4,8 liegt (AKOPYAN et al. 1975), wobei aber das Enzym bei der Lupine über 90 % inaktiviert wurde. Das pH-Optimum liegt bei Escherichia coli bei 9,0 (DUNHILL und FOWDEN 1965), Enterobacter bei 10,0 (YANASE et al. 1982a), Lotus bei 9,0 (FLOSS et al. 1965) und bei der Lupine bei 9,5 (HENRICKSON und CONN 1969) oder 8,8 (AKOPYAN et al. 1975).

Unsere Messung ergab einige Probleme, da bei der pH-Bestimmung die optische Dichte des gebildeten Schwefelwasserstoffes im stark alkalischen Milieu am höchsten war (Abb. 44) aber nach Umrechnung mit dem H_2S-Eichwert bei 7,5 lag und nur in geringem Maße auch wieder im Alkalischen gesteigert war. Diese Versuchsdaten widersprechen allen bisherigen Daten, so daß das Enzym weiterhin in stark alkalischer Lösung gemessen wurde.

Bei der Diskussion der K_m-Werte muß bedacht werden, daß die ß-Cyanoalaninsynthethase gattungsspezifisch entweder mit L-Cystein oder L-Serin oder O-Acetyl-L-

Serin die besten Umsaätze zeigt. Für L-Cystein als Substrat wurde bei Escherichia coli ein K_m-Wert von 5 mM (DUNNILL und FOWDEN 1965), bei Lotus von 0,05 mM (FLOSS et al. 1965), Lupine von 2,5 mM (HENRICKSON und CONN 1969) und Mais von 2,6 mM (STULEN et al. 1979) gemessen, so daß unser K_m-Wert von 0,33 mM für Chlorella im gleichen Bereich liegt (Abb. 49). Für L-Serin wurde ein K_m-Wert bei Escherichia coli zu 8,0 mM (DUNNILL und FOWDEN 1965) und Chromobacterium zu 1,6 mM (RODGERS 1982) bestimmt, während der K_m-Wert für O-Acetyl-L-Serin bei Chromobacterium 0,44 mM (RODGERS 1982) und bei Enterobacter 0,7 mM (YANASE et al. 1982b) beträgt. Der K_m-Wert bezüglich Cyanid ist stark pH-abhängig. Das Cyanidion ist das eigentliche Substrat, so daß die K_m-Werte auf den tatsächlichen Cyanidgehalt umgerechnet werden müssen, was meist nicht geschah. Bei Escherichia coli beträgt der K_m-Wert für Cyanid 13 mM (DUNNILL und FOWDEN 1965), während bei Lotus gezeigt wurde (FLOSS et al. 1965), daß er für pH 7,5 bei 0,4 mM und für pH 9,0 bei 0,15 mM liegt und nach Berücksichtigung der wahren Cyanidkonzentration 0,005 mM sein dürfte. Enterobacter hat bei pH 8,5 einen K_m-Wert von 5,2 mM (YANASE et al. 1982b), Lupine bei pH 8,5 (HENRICKSON und CONN 1969) bzw. pH 8,8 (AKOPYAN et al. 1975) einen K_m-Wert von 0,55 mM und Mais bei pH 8,3 von 0,53 mM. Bei Chlorella liegt der K_m-Wert erheblich höher (12,5 mM bei pH 10,6), was auf den hohen pH-Wert und die Seitenaktivität der ß-Cyanoalaninsynthetase von der Cysteinsynthase zurückzuführen ist.

Die Substratspezifität hängt weitgehend vom Typ der ß-Cyanoalaninsynthetase ab, da wie oben beschrieben, L-Cystein das Hauptsubstrat bei Lupine (HENRICKSON und CONN 1969; AKOPYAN et al. 1975), Hirse, Wicke, Klee (BLUMENTHAL et al. 1968) Acacia (MEAD und SEGAL 1981), Lotus (FLOSS et al. 1965) und Chlorella (Tab. 39), L-Serin bei Escherichia coli (DUNNILL und FOWDEN 1965), Chromobacterium (RODGERS 1982) und in geringerem Maße bei Lotus (FLOSS et al. 1965) und O-Acetyl-L-Serin bei Enterobacter (SAKAI et al. 1981) ist. Nur Bacillus megaterium zeigt mit L-Cystein wie auch mit O-Acetyl-L-Serin gleich gute Umsätze (CASTRIC und CONN 1971). Betrachtet man die Ergebnisse mit L-Cystein als Hauptsubstrat so fällt auf, daß Chlorella eine erheblich unspezifischere ß-Cyanoalaninsynthetase besitzt (Tab. 39) als Lupine oder Lotus. So kann die Lupine D-Cystein nur zu 0,2 % (HENRICKSON und CONN 1969), Chlorella aber zu 43 % (Tab. 39) verwerten. O-Acetyl-L-Serin ist bei Lupine ein schlechtes Substrat (5,4 %; HENRICKSON und CONN 1969), während L-Serin nur bei Lotus (20 %; FLOSS et al. 1965) nicht aber bei Lupine (AKOPYAN et al. 1975), Klee, Hirse und Wicke (BLUMENTHAL et al. 1968) ein Substrat ist. Bei Lupine sind auch N-Acetylserin (HENRICKSON und CONN 1969), Phospho-L-Serin (AKOPYAN et al. 1975; HENRICKSON und CONN 1969), S-Methyl-L-Cystein (HENRICKSON und CONN 1969), Alanin (AKOPYAN et al. 1975) und O-Succinyl-L-Serin (HENRICKSON und CONN 1969)

keine Substrate.

Bei Bacillus megaterium wird L-Serin zu 5 % umgesetzt, während L-Homocystein kein, aber bei Chlorella ein Substrat ist (13,5 % , Tab. 39). Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß sowohl Lupine L-Cystin (0,5 % , HENRICKSON und CONN 1969 ; 8 % , AKOPYAN et al. 1975),wie auch Chlorella, Disulfide als Akzeptoren verwenden kann (Tab. 39 und 40). Dabei ist die Menge an freigesetztem Schwefelwasserstoff fast der Menge an Ketogruppen gleich, während die Menge an Thiocyanat erheblich höher ist (Tab. 39 und 40). Cystin, Homocystin und oxidiertes Glutathion reagieren nicht direkt mit dem Enzym, sondern werden in einer chemischen Reaktion (Cyanolyse) durch den nucleophilen Angriff des Cyanidions zu Cystein, Homocystein und reduziertem Glutathion gespalten, wobei zusätzlich ß-Cyanocystein, ß-Cyanohomocystein und Cyanoglutathion entstehen, wie dies exemplarisch für Cystein in Gleichung (68) gezeigt wird.

$$\underset{\text{Cystin}}{CySSCy} + HCN \longrightarrow CySH + \underset{\text{ß-Cyanocystein}}{CySCN} \qquad (68)$$

$$CySCN + HCN \longrightarrow HSCN + \underset{\text{ß-Cyanoalanin}}{Ala(CN)} \qquad (69)$$

$$CySH + HCN \longrightarrow H_2S + Ala(CN) \qquad (70)$$

Diese Produkte sind ihrerseits selbst Substrate für die ß-Cyanoalaninsynthetase, wobei Thiocyanat freigesetzt wird und ß-Cyanoalanin entsteht ((69); AKOPYAN et al. 1975). Die bei der chemischen Reaktion entstandenen Aminosäuren, Cystein, Homocystein und reduziertes Glutathion, können sodann mit Cyanid reagieren und Schwefelwasserstoff freisetzen (70). Die Bildung von Ketogruppen könnte ein Hinweis auf eine Cystinlyase sein, die bisher nicht gefunden wurde (APPELTAUER 1984 ; (71),(72a,b), (69)).

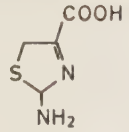
$$\underset{\text{Cystin}}{CySSCy} \longrightarrow \underset{\text{Thiocystein}}{CySSH} + NH_3 + \underset{\text{Pyruvat}}{CH_3\text{-}CO\text{-}COOH} \qquad (71)$$

$$\underset{\text{Thiocystein}}{CySSH} + HCN \longrightarrow H_2S + \underset{\text{ß-Cyanocystein}}{CySCN} \qquad (72a)$$

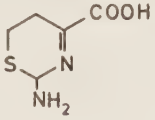
$$CySSH + HCN \longrightarrow HSCN + CySH \qquad (72b)$$

$$CySCN + HCN \longrightarrow HSCN + Ala(CN) \qquad (69)$$

Die labilen Thiocyanoverbindungen bilden, sofern sie nicht enzymatisch umgesetzt werden, cyclische Verbindungen, wie 2-Amino-Thiazolidin-4-carbonsäure (XXV) für Cystin (GAWRON und FERNANDO 1961, AKOPYAN et al. 1975) und 2-Aminopenthiazolidin-4-carbonsäure für Homocystin (XXVI) (RESSLER et al. 1973).

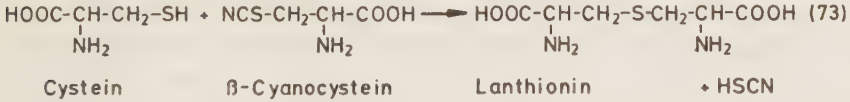


(XXV)



(XXVI)

Diese Reaktion ist erheblich schneller als der Austausch der Thiocyanogruppe durch das freigewordene Mercaptid wie Cystein oder Homocystein, wobei Lanthionin oder Homolanthionin entstehen würde (73) (GAWRON und FERNANDO 1961).

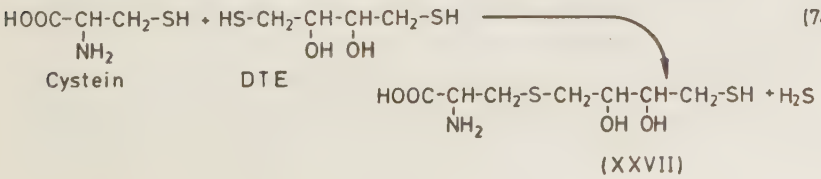


Cystein ß-Cyanocystein Lanthionin + HSCN

Eine Austauschreaktion des Enzyms von ß-Cyanoalanin oder S-Hydroxyäthylcystein mit Cyanid, findet bei der Lupine nicht statt (AKOPYAN et al. 1975). Das Enzym von Chlorella kann nicht nur mit Cyanid ß-Cyanoalanin, sondern auch mit Thiocyanat ß-Cyanocystein bilden (Tab. 39), wie das bisher nicht für Enterobacter (YANASE et al. 1982b) gefunden wurde.

Bei der Lupine kann Mercaptoäthanol Cyanid ersetzen, wobei S-Hydroxycystein entsteht (AKOPYAN und GORYACHENKOVA 1976). Bei der Gruppe von Organismen, die L-Serin als Substrat verwenden, nimmt Chrombacterium O-Acetyl-L-Serin (5%, RODGERS 1982) als Substrat, während L-Cystein, L-Threonin und L-Alanin nicht verwertet werden können.

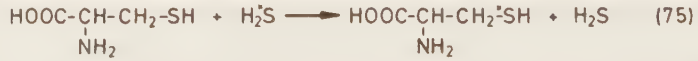
Enterobacter, der O-Acetyl-L-Serin als Substrat benutzt, zeigt mit L-Serin L-Cystein, N-Acetyl-L-Serin, S-Methyl-L-Cystein, Alanin, Asparagin (SAKAI et al. 1981, YANASE et al. 1982b), Phosphoserin, Glutamin, Threonin (YANASE et al. 1982b) und L-Cystin (SAKAI et al. 1981) keinen Enzymumsatz. Die Steigerung der Schwefelwasserstoffabgabe durch DTE (Tab. 39) mit L-Cystein als Substrat bei Chlorella könnte auf den Austausch der Thiolgruppe des Cysteins mit DTE zurückzuführen sein (74), wobei der Thioäther DTE-Cystein (XXVII) entsteht.



Cystein DTE

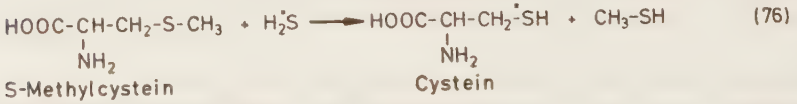
(XXVII)

Eine Hemmung des Enzyms wurde bisher nur für Phosphoserin (8 mM, 76 %), L-Cystein (4 mM, 95 %) und Schwefelwasserstoff (2 mM, 96 % ; DUNNILL und FOWDEN 1965) für Escherichia coli und L-Methionin (2 mM 60 % ; RODGERS und KNOWLES 1978) bei Chromobacterium beobachtet. Das Molekulargewicht der ß-Cyanoalaninsynthetase von Chlorella beträgt 68 000 (Abb. 42), wie dies auch für Enterobacter beobachtet wurde, wobei sie aus zwei Untereinheiten bestehen soll (YANASE et al. 1982b). Bei Bacillus megaterium liegt es zwischen 60 - 70 000 (CASTRIC und CONN 1971) und bei der Lupine bei 54 000 (HENRICKSON und CONN 1969) oder 52 000 (AKOPYAN und GORYACHENKOVA 1976). Da Cyanid bei den meisten Pflanzen nicht gehäuft vorliegt, diese aber die ß-Cyanoalaninsynthetase besitzen, stellt sich die Frage nach der Funktion dieses Enzyms.
Auch nicht cyanogene Pflanzen können Cyanid durch Abbau des Glyoxylats, das bei der Photorespiration anfällt, über die Addition von Hydroxylamin zu Glyoxyloximin, den Abbau des Glycins (BRYSK et al. 1969) oder den Abbau von Histidin (VENNESLAND 1981) bilden, das für die Zellen toxisch ist, da die Atmungskette durch Cyanid gehemmt wird. Die ß-Cyanoalaninsynthetase stellt somit neben der cyanidresistenten Atmung ein Entgiftungsenzym dar, wobei das ß-Cyanoalanin mit der ß-Cyanoalaninhydrolase oder -nitrilase zu Asparagin umgesetzt wird (CASTRIC et al. 1972 ; Schema M).
Als viertes Enzym soll nun noch kurz auf die Austauschreaktion eingegangen werden, wobei die Thiolgruppe des Cysteins mit Schwefelwasserstoff austauschen kann (75). Diese Enzymaktivität verhält sich bei der Aufreinigung an einer DEAE-Säule bei Chlorella (SCHMIDT 1977b) und Spinat (SCHMIDT 1977a) wie die Cysteinsynthase. Das pH-Optimum liegt über 9,5 bei Synechococcus (DIESSNER und SCHMIDT 1981), Chlorella (SCHMIDT 1977b) und Spinat (SCHMIDT 1977a).



(75)

Auch die Austauschreaktion mit S-Methyl-L-Cystein (76) hat ein Maximum bei 10,0 (Abb 44), wobei aber hier der chemische Austausch abgezogen werden mußte.



(76)

Die Reaktion ist bei Spinat und Chlorella für eine Stunde linear (SCHMIDT 1977a,b). Obwohl diese Enzymaktivität auch für Salmonella (COOK und WEDDING 1976), Brassica (THOMPSON und MOORE 1968) und Lupine (HENRICKSON und CONN 1969) bekannt ist, liegen nur für Chlorella und Spinat K_m-Werte vor.
Der K_m-Wert bezüglich L-Cystein liegt bei Spinat bei 3,3 mM und für Schwefelwasserstoff für pH 8,0 bei 0,87 mM (SCHMIDT 1977a) und für Chlorella für Schwefelwasserstoff für pH 7,5 wie pH 9,0 bei 0,49 mM (SCHMIDT 1977b) und

beträgt somit nur 1,5 % des K_m-Wertes für die Cysteinsynthase dieser Alge. Die Substratspezifität ist bei Chlorella auf L-Cystein (100 %) und O-Acetyl-L-Serin (120 %) beschränkt (SCHMIDT 1977b), während Spinat neben L-Cystein (100 %) und O-Acetyl-L-Serin (380 %) auch D/L-Homocystein (40 %) als Substrat verwerten kann (SCHMIDT 1977a).
Für beide Organismen sind Phosphoserin, L-Serin, Phosphohomoserin und Cysteinsäure keine Substrate. Ein Austausch von Cystein und S-Methylcystein wird nicht nur bei Aerobacter (OHKISHI et al. 1981b), sondern auch für Chlorella (Tab. 41) beobachtet, wobei auch S-Äthyl-L-Cystein nicht aber L-Cysteinsäure ein Substrat sein können. Das Molekulargewicht dieses Enzyms liegt bei Spinat bei 64 000 (SCHMIDT 1977a) und bei Chlorella bei 63 000 (SCHMIDT 1977b).

3.7.5.2 Cysteinsynthase, ein multifunktionales Enzym

Ein Hauptziel der Anreicherung der Cysteinsynthase war die Klärung der Frage, ob die Cysteinsynthase auch die Seitenaktivitäten der L-Cysteindesulfhydrase ß-Cyanoalaninsynthetase und der Austauschreaktion enthält. Bei der Aufreinigung der Cysteinsynthase von Chlorella konnte keine Abtrennung der L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthase erzielt werden (Abb. 35, 37 und 38), wobei diese Aktivitäten in gleichem Maße angereichert wurden (Tab. 34).
Die erhöhte Anreicherung der Cysteinsynthase (20-fach gegenüber 8-fach) ist ebenso ein Hinweis auf das Vorliegen von zwei Cysteinsynthasen, wie die Enzymfraktionen an der Affigel-Blue-A-Säule (Abb. 39), wobei eine Cysteinsynthase nur für O-Acetyl-L-Serin und Schwefelwasserstoff spezifisch, die andere für die drei Aktivitäten unspezifisch zu sein scheint.
Die Eigenschaften der drei Enzymaktivitäten sind bezüglich Protein- (Abb. 43) und Zeitabhängigkeit (Abb. 44) sowie des Einflusses von Pyridoxalphosphat (Tab. 42) gleich. Sie unterscheiden sich aber wegen der chemischen Eigenschaften der Substrate, beim pH-Optimum (Abb. 44) und der Substratspezifität (Tab. 35, 37, 39 und 41) erheblich.
Im Folgenden soll die Identität der Enzymaktivitäten einzeln abgehandelt werden. Die Rückreaktion der Cysteinsynthase soll 1000 mal langsamer als die Hinreaktion bei Phaseolus sein (BERTAGNOLLI und WEDDING 1977).
Bei Chlorella scheinen die Cysteinsynthase- und L-Cysteindesulfhydraseaktivität einem Enzym zugeschrieben werden zu müssen, wobei letztere Aktivität nur 0,4 % der Cysteinsynthaseaktivität ausmacht. Beide Enzyme zeigen auf der Sephadex-G-50-Säule (Abb. 35 und 38), an DEAE-Sephacel (Abb. 37), DEAE-Biogel-A (Abb. (Abb. 40) und Biorad-A-1,5m (Abb. 41) gleiches Elutionsverhalten.
Dies wurde schon von SCHMIDT und ERDLE (1983) beobachtet, während HALL und

SMITH (1983) dieser Ansicht widersprechen. Sie betrachten die Cysteinsynthase und L-Cysteindesulfhydrase als zwei getrennte Proteine, wobei letzteres aber O-Acetylserinlyase- und Cysteinlyaseaktivität besitzen soll. Als Argument für ihre These führen diese Autoren an, daß bisher weder bei Phaseolus (BERTAGNOLLI und WEDDING 1977 , SMITH 1972, SMITH und THOMPSON 1971) noch bei Raps (MASADA et al. 1975) und Lupine (AKOPYAN et al. 1975) eine L-Cysteindesulfhydrase gefunden werden konnte. Das Vorkommen dieses Enzyms bei Bakterien, wie Salmonella (KREDICH et al. 1973) und Enterobacter (UREN et al. 1978) ist kein Beweis für die Existenz dieses Enzyms bei Pflanzen, da die Eigenschaften des bakteriellen Proteins von denen bei Chlorella stark abweichen. Die geringe Aktivität gegenüber der Cysteinsynthase sowie die parallele Regulation durch verschiedene Schwefelquellen (3.4.5.7a) sind gewichtige Hinweise für die Identität beider Aktivitäten bei Chlorella.

Unsere Ergebnisse für die Aufreinigung der ß-Cyanoalaninsynthetase legen auch hier ein gemeinsames Protein nahe (Abb. 35, 37 und 38). Ein identisches Verhalten an DEAE- und Sephadex-G-100-Säulen wurde auch für Bacillus megaterium beobachtet (CASTRIC und CONN 1971). Die ß-Cyanoalaninsynthetase muß eine Seitenaktivität der Cysteinsynthetase sein, da sie nur 0,4 % von dieser bei Chlorella (Tab. 34) beträgt, wie dies auch bei Enterobacter (0,32 %,YANASE et al. 1982 a,b), Vitia sativa (1,4 %, NIGAM und McCONNELL 1971) und Lupine (10 %, HENRICKSON und CONN 1969) beobachtet wurde. Bei letzterem Organismus wurde die ß-Cyanoalaninsynthetase 30-fach stärker als die Cysteinsynthase angereichert, so daß die Autoren, auch wegen der unterschiedlichen Molekulargewichte beider Enzyme, Zweifel an deren Identität bei Lupine anmelden .

Die Daten für die beiden Enzyme bei Chlorella enthalten allerdings keine solche Widersprüche, so daß wir nur ein Protein für beide Aktivitäten annehmen dürfen, wie dies auch für Chromobacterium (RODGERS 1982), Escherichia coli (DUNNILL und FOWDEN 1965), Enterobacter (YANASE et al. 1982a,b), Bacillus megaterium (CASTRIC und CONN 1971) und Vitia sativa (NIGAM und McCONNELL 1971) als einziger Pflanze bisher angenommen wird.

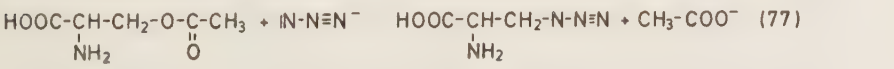
Auch die Austauschreaktion mit Schwefelwasserstoff scheint von der Cysteinsynthase bei Hefe (THOMPSON und MOORE 1968), Chlorella (SCHMIDT 1977b) und Spinat (SCHMIDT 1977a) durchgeführt zu werden.

Angereicherte Cysteinsynthasen können auch einen Austausch mit Methanthiol, Äthanthiol und Mercaptoäthanol zu S-Methyl-, S-Äthyl- und S-Hydroxyäthylcystein bei Enterobacter (YANASE et al. 1982b) und zusätzlich mit Cysteamin und Homocystein bei Catharanthus (SCHWENN et al. 1983) ausführen. Methanthiol

kann bei Lupine (HENRICKSON und CONN 1969) mit Cystein und bei Spinat (GIOVANELLI und MUDD 1968), Salmonella und Kohlrübe (THOMPSON und MOORE 1968) Escherichia coli und Zwiebel (GRANROTH und SARNESTO 1974) mit O-Acetyl-L-Serin austauschen, wie dies auch unsere Cysteinsynthase (Tab. 41) mit L-Cystein und S-Methyl- oder S-Äthylcystein durchführt. Trotzdem bezweifeln SMITH und THOMPSON (1971), daß in vivo die S-Methylcysteinsynthase eine Seitenaktivität der Cysteinsynthase ist, wenngleich sie dies in vitro für bewiesen ansehen.

Wir versuchten auch der Frage nachzugehen, ob die Cysteinsynthase bei Chlorella eine Triazolylaseaktivität enthält, wobei 1,2,4-Triazol als Sulfidanalog mit O-Acetyl-L-Serin zu 1,2,4-Triazol-1-alanin reagiert (23), wie dies bei Salmonella beobachtet wurde (KREDICH et al. 1975). Um dies zu klären, bestimmte man die Triazolylaseaktivität nach 2.5.11. Die Versuchsergebnisse, die eine Triazolylaseaktivität in Chlorella andeuten (Ergebnisse nicht näher dargestellt), waren deshalb nicht aussagekräftig, da Triazol selbst schon mit Ninhydrin einen Komplex bildet, der bei 480 nm und 292 nm eine starke Eigenabsorption besitzt und somit den Aminosäurenachweis bei 460 nm stört. Eine Identität der Triazolylase mit der Cysteinsynthase bei Chlorella bleibt somit offen.

Abschließend sei noch erwähnt, daß die Cysteinsynthase der Gerste O-Acetyl-L-Serin mit Natriumazid umsetzen kann, wobei ß-Azidoalanin (77) entsteht (ROSICHAN et al. 1983).



ß-Azidoalanin

Pyridoxalphosphat könnte als Coenzym eine wichtige Rolle bei der Multifunktionalität der Cysteinsynthase spielen, obwohl sein Mitwirken weder aus dem Absorptionsspektrum der angereicherten Enzymfraktion, die im entscheidenen Bereich zwischen 350 und 450 nm kein Maximum aufweist, noch aus der fehlenden Steigerung der Enzymaktivitäten nach Pyridoxalphosphatzugabe abgeleitet werden kann.

Die Enzymaktivitäten der multifunktionalen Cysteinsynthase, wie Cysteinsynthase, L-Cysteindesulfhydrase und ß-Cyanoalaninsynthetase, wurden durch Pyridoxalphosphat sogar etwas gehemmt, wie dies bei der Cysteinsynthase für Chromatium (HENSEL und TRÜPER 1976), Chlorella (SCHMIDT 1977b), Spinat (GIOVANELLI und MUDD 1967), Bohne (SMITH und THOMPSON 1971, BERTAGNOLLI und WEDDING 1977), und von Rettich (TAMURA et al. 1976) bekannt ist. Auch die ß-Cyanoalaninsynthase konnte durch Pyridoxalphosphatzugabe bei der Lupine nicht gesteigert werden (HENRICKSON und CONN 1969). Pyridoxalphosphat wurde dagegen als Coenzym der Cysteinsynthase bei Enterobacter (YANASE et al. 1982b), Salmonella (BECKER

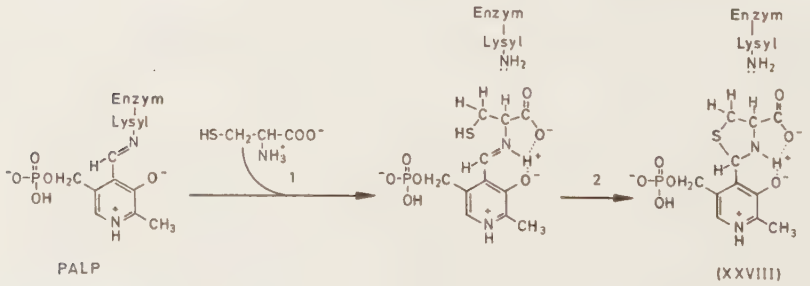
et al. 1969), Hefe (YAMAGATA 1976), Raps (MASADA et al. 1974), Klee (NG und ANDERSON 1978a), Spinat (GIOVANELLI und MUDD 1968) und Catharanthus (SCHWENN et al. 1983) gefunden. Auch die L-Cysteindesulfhydrase von Salmonella (KREDICH et al. 1972) und Aerobacter (KUMAGAI et al. 1975b), wie auch die ß-Cyanoalaninsynthetase von Enterobacter (YANASE et al. 1982a), Lupine (AKOPYAN et al. 1975, AKOPYAN und GORYACHENKOVA 1976, HENRICKSON und CONN 1969) und Lotus (FLOSS et al. 1965) sowie das Austauschprotein von Salmonella (COOK und WEDDING 1976) und Catharanthus (SCHWENN et al. 1983) sind Pyridoxalphosphat-abhängige Enzyme.

Erst der Einsatz spezifischer Hemmstoffe (Tab. 42) lieferte eindeutige Hinweise auf die Beteiligung von Pyridoxalphosphat bei allen Enzymaktivitäten der Cysteinsynthase.

Unsere Versuche wurden im Phosphatpuffer durchgeführt, da die Aminogruppe des Trispuffers mit der Aldehydgruppe des Pyridoxalphosphates eine Schiff'sche Base bilden und somit das Coenzym inaktivieren soll (FEDERIUK und SHAFER 1981), was bei unseren Untersuchungen aber nicht beobachtet werden konnte.

Dies wird z. B. durch die Bilanzierung der Reaktionsprodukte der D-Cysteindesulfhydrase von Escherichia coli verdeutlicht, die im Trispuffer deutlich höhere Werte für Schwefelwasserstoff und Ammoniumionen als für Pyruvat lieferte, während im Phosphatpuffer äquimolare Mengen gemessen wurden (SAZ und BROWNELL 1954).

Der negative Einfluß von Cystein auf die verschiedenen ß-Eliminationsreaktionen der Cysteinsynthaseaktivitäten, kann auf die Reaktion von Cystein mit PALP zurückgeführt werden (Schema E), die eine Endprodukthemmung der Cysteinsynthase erklären würde. Bei der Bildung einer Schiff'schen Base (E1) nimmt



Schema E : Chemische Reaktion von Cystein mit Pyridoxalphosphat

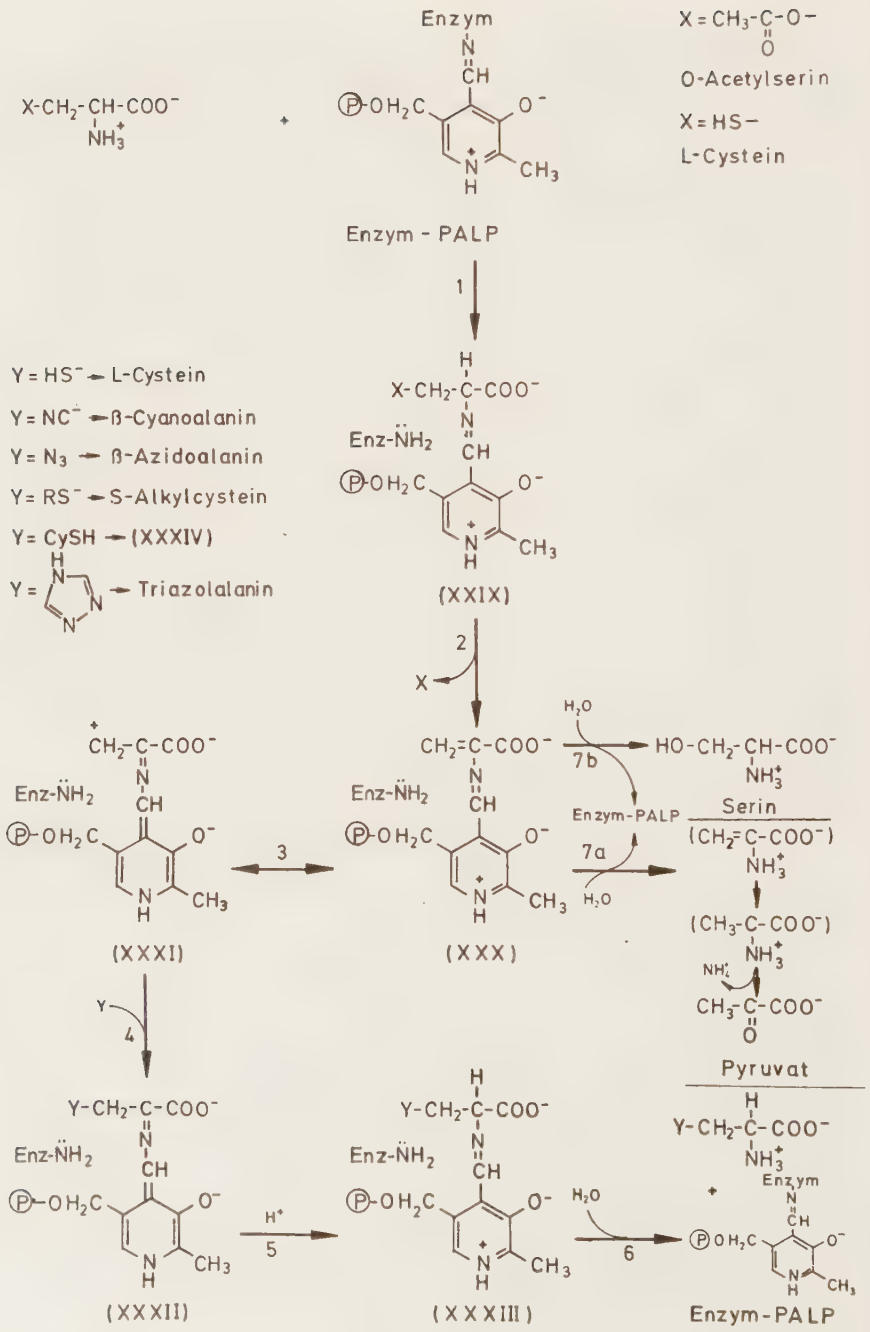
die Thiolgruppe des Cysteins eine cis-Stellung zum Iminostickstoff der Schiff'schen Base ein, so daß eine Cyclisierung, besonders unter alkalischen Bedingungen , zur Pyridoxalphosphat-gebundenen Thiazolidin-4-carbonsäure (XXVII) erfolgt (E2; BUELL und HANSEN 1960 , ABBOTT und MARTELL 1970).

Die Hemmversuche wurden bei Chlorella mit Hydroxylamin und Aminooxyessigsäure, die spezifische Carbonylgruppenhemmstoffe sind, sowie Cycloserin, einem direkten Hemmstoff des Pyridoxalphosphates, durchgeführt (Tab. 42). Prinzipiell kann die Hemmung durch die Vorinkubation mit Pyridoxalphosphat teilweise verhindert werden. Die Cysteinsynthase wird besonders durch Aminooxyessigsäure bei Chlorella (Tab. 42), Enterobacter (YANASE et al. 1982b ; 47 % Hemmung), Rettich (TAMURA et al. 1976) und Phaseolus vulgaris (SMITH und THOMPSON 1970 ; 10 mmol , 75 % Hemmung) gehemmt.

Die L-Cysteindesulfhydrase von Chlorella wird durch Hydroxylamin und Aminoessigsäure stark und durch Cycloserin zur Hälfte gehemmt, wie dies bei der Gurke mit Aminooxyessigsäure (1mM, 94 % Hemmung, SEKIYA et al. 1982b) beobachtet wurde. Die ß-Cyanoalaninsynthetase wurde durch Hydroxylamin, Aminooxyessigsäure sowie durch Cycloserin um etwas mehr als die Hälfte gehemmt. Hydroxylamin senkt die Enzymaktivität bei Enterobacter um 64 % (20 mM , YANASE et al. 1982b) und bei der Lupine um 75 % (1 mM , HENRICKSON und CONN 1969), während Aminooxyessigsäure dies bei der Lupine um 74 % (1 mM, AKOPYAN et al. 1975) tut. Cycloserin und Penicillamin bleiben stets ohne Wirkung. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Cysteinsynthase ein relativ stark gebundenes PALP enthalten muß, auf deren Zusammenwirken im Folgenden eingegangen werden soll.

Pyridoxalphosphat weist als Coenzym von Substitutions- und Eliminationsreaktionen ein unterschiedliches Verhalten auf, welches auch die unterschiedliche Wirkung der Hemmstoffe erklären kann. Am Beispiel der Cysteinsynthase, die zur Gruppe der ß-Substitutionsreaktionen gehört, soll der molekulare Mechanismus erklärt werden (Schema F).

Pyridoxalphosphat (PALP) ist als Coenzym meist über eine Azomethinbrücke mit einem Lysinrest des Proteins kovalent gebunden. Bei Zutritt einer nucleophilen Verbindung, wie O-Acetyl-L-Serin, findet ein nucleophiler Angriff an die Schiff'sche Base von Pyridoxalphosphat und Lysinrest statt, der zur Transiminierung führt, die über die labile Zwischenstufe eines Aminocarbinols unter Dehydratation zum Imin (F1) einer Schiff'schen Base (XXIX) führt (DAVIS und METZLER 1972). Dabei ist die Acetylgruppe in cis-Stellung zum α-Proton und in trans-Stellung zum Iminostickstoff. Eine Cyclisierung zur Pyridoxalphosphat-gebundenen Thiazolidin-4-carbonsäure (XXVIII) unterbleibt daher. Bei der an-



Schema F : Reaktionsmechanismen von Pyridoxalphosphat

schließenden Protonenverschiebung kommt es zur Abspalung der Acetylgruppe, wobei ein α-Aminoacrylat (XXX) entsteht, welches mit dem Pyridoxalphosphat ein Aldimin bildet (F2). Dieses kann in einer basenkatalysierten Reaktion, die durch den Lysinrest des Proteins bedingt ist, zu einem Ketimin (XXXI) tautomerisiert werden (G3), so daß das endständige C-ß-Atom positiv geladen ist. Mit Schwefelwasserstoff erfolgt hier ein nucleophiler Angriff, bei dem ein Pyridoxalphosphat-gebundenes Cystein (XXXII) entsteht (F4). Durch erneute Tautomerisierung zum Aldimin (F5) bildet sich wieder die Schiff'sche Base (XXXIII), an der dann der Lysinrest des Proteins über eine Transiminierung binden und das Cystein freisetzen kann (F6 ; MEAD und SEGAL 1973, DIESSNER und SCHMIDT 1981). Diese Reaktion ist für O-Acetyl-L-Serin spezifisch (FLOSS et al. 1976). Es handelt sich also um eine geordnete Ping-Pong-Bi-Bi-Reaktion, wie sie auch von COOK und WEDDING (1976) beschrieben wurde.

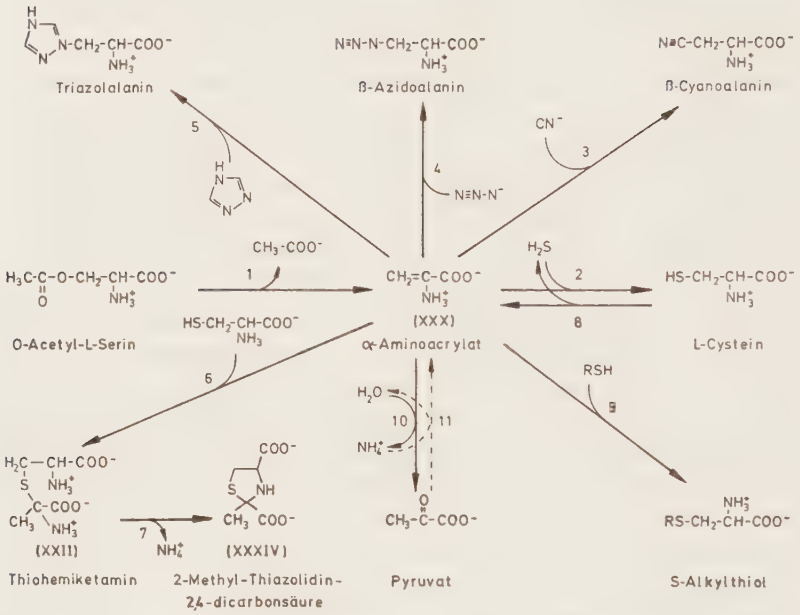
Dabei soll die Austauschaktivität der Cysteinsynthase als ß-Substitutionsreaktion mit Schwefelwasserstoff oder Methylmercaptan nach dem gleichen Ping-Pong-Mechanismus verlaufen (COOK und WEDDING 1976). Die für L-Cystein spezifische ß-Cyanoalaninsynthetase (TSAI et al. 1978) könnte auch über die Bildung eines ternären Komplexes von L-Cystein und Cyanid erfolgen, der durch eine Konformationsänderung zur ß-Cyanoalaninbildung führt.

Die Hemmstoffe Hydroxylamin und Aminooxyessigsäure werden von der Carbonylgruppe des Pyridoxalphosphates wie ein Substrat gebunden und bilden eine Schiff'sche Base. Eine Protonenverschiebung ist wegen ihrer N-O-Bindung nicht möglich, so daß das Enzym reversibel gehemmt wird (LAK et al. 1970). Pyridoxalphosphatzugabe kann diese Wirkung wieder teilweise aufheben (Tab. 42).

Cycloserin hat bei den von uns untersuchten Enzymaktivitäten nur in hohen Konzentrationen einen negativen Einfluß (Tab. 42), was dem bisher diskutierten Wirkungsmechanismus widerspricht. Cycloserin wird wie eine Aminosäure gebunden und bildet aber nach Aufspalten des Isoxazolidinringes ein kovalent, irreversibel gebundenes Acylderivat, das die Rückreaktion vom Ketimin zum Aldimin (F5) unterbindet (KARPEISKII und BREUSOV 1965, LAK et al. 1970).

Da die untersuchten Enzyme ß-Substitutionsenzyme sind, die eine Ketiminform durchlaufen, sollten sie durch Cycloserin gehemmt werden. Dies widersprüchliche Verhalten muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Multifunktionalität der Cysteinsynthase wird durch das bei dieser Reaktion entstandene α-Aminoacrylat bedingt sein, dessen Schlüsselfunktion in Schema G dargestellt ist.



Schema G : Reaktionen um das α-Aminoacrylat des Pyridoxalphosphates

Folgende Reaktionen laufen bei folgenden Enzymen ab :

1 + 2 : Cysteinsynthase
8 + 10 : L-Cysteindesulfhydrase
8 + 6 + 7 : L-Cysteindesulfhydrase
8 + 2 : Austauschreaktion mit Schwefelwasserstoff
8 + 9 : Austauschreaktion mit S-Alkylthiolen
8 + 3 : ß-Cyanoalaninsynthetase
8 + 4 : ß-Azidoalaninsynthase
8 + 5 : Triazolylalaninsynthase
1 + 10 : O-Acetyl-L-Serinlyase

α-Aminoacrylat entsteht bei der ß-Elimination

a) durch das Abspalten der Acetylgruppe des O-Acetylserins mit der Cysteinsynthase (G1) und

b) durch Freisetzen von Schwefelwasserstoff mit der L-Cysteindesulfhydrase (G8).

Es ist Ausgangssubstrat für folgende Reaktionen, von denen die Reaktionen 3 - 10 bei der ß-Substitution und Reaktion 1 bei der ß-Elimination ablaufen.

c) Bildung von Cystein mit der Cysteinsynthase durch die Anlagerung des nucleophilen Schwefelwasserstoffes an das C-3-Atom des α-Aminoacrylates.

d) Bei Cysteinüberschuß kann sich ein weiteres Cysteinmolekül an das C-2-Atom des α-Aminoacrylates anlagern, um das Hemimercaptal (XXII) zu bilden, welches zur 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure (XXXIV) cyclisiert (G7; SODA 1983). Diese Reaktion tritt bei der L-Cysteindesulfhydrase auf.

e) Lagert sich das zweite Cysteinmolekül an C-3 an, so sollte Lanthionin (73) gebildet werden, was aber bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

f) Bei der Austauschreaktion mit Schwefelwasserstoff lagert sich ein anderes Schwefelwasserstoffmolekül als das zuvor freigesetzte (G8) an die Doppelbindung an, um erneut Cystein zu bilden (G2).

g) Erfolgt der Austausch mit Alkylthiolen wie Methanthiol, so werden S-Alkylcysteine wie S-Methylcystein gebildet (G9).

h) Bei der Anlagerung von Cyanid entsteht ß-Cyanoalanin (G3).

i) In gleicher Weise wird ß-Azidoalanin mit Natriumazid gebildet (G4).

k) Mit Triazol wird Triazolylalanin synthetisiert (G5).

l) Findet dagegen keine Anlagerung statt, so wird bei der L-Cysteindesulfhydrase in einer ß-Elimination Pyruvat und Ammoniumionen freigesetzt. Die Rückreaktion konnte bei Aerobacter (KUMAGAI et al. 1974; OHKISHI et al. 1981b) beobachtet werden (G 11).

Auffallend ist, daß die Anlagerung der nucleophilen Verbindungen sowohl an C-2 wie an C-3 erfolgen kann, für das bisher keine Erklärung gegeben werden kann.

Diese Eigenschaften des α-Aminoacrylates sind die Ursache der Multifunktionalität der Cysteinsynthase von Chlorella.

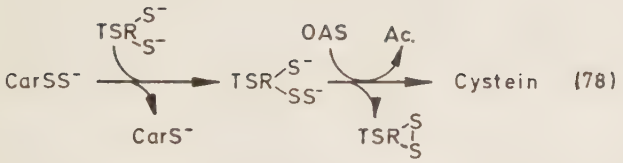
3.7.5.3 S-Sulfocysteinsynthase, eine zusammengesetzte Enzymaktivität

Die S-Sulfocysteinsynthase ist bisher nur von Bakterien, wie Escherichia coli und Pseudomonas aerogenes (CHAMBERS und TRUDINGER 1971) und phototropen Bakterien, wie Rhodospirillum tenue, Thiocapsa roseopersecina, Ectothiorhodospira mobilis und Chromatium vinosum (HENSEL und TRÜPER 1976) bekannt.

Obwohl unter den gewählten Testbedingungen auch bei Chlorella eine "S-Sulfocysteinsynthase" im Rohextrakt gemessen werden kann, waren Zweifel an ihrer Existenz angebracht, da das von den Autoren verwendete Nachweisverfahren mit dem Gaitonde-Reagenz (3.3.1.2.1) auch Cystein nachweisen kann (Tab. 6 , Abb. 13). Da meist in der Literatur eine Produktanalyse mit einer Dünnschichtelektrophorese (3.3.2.2) z.B. unterblieb, kann die Existenz dieses Enzyms nicht als bewiesen gelten. Daher bestimmte man die Reaktionsprodukte dieses Enzymansatzes (3.7.4.1) auf einer Trisacryl-GF05-Säule. Bei Chlorella konnte kein S-Sulfocystein nachgewiesen werden, so daß diese Alge zumindest keine S-Sulfocysteinsynthase enthält.

Bei den Enzymtesten muß bedacht werden, daß nie DTE im Reaktionsansatz vorhanden ist, da dieses S-Sulfocystein als "Buntes Salz" sofort chemisch zu Cystein und Sulfit spalten würde (Schema L ; NAKAMURA und TAMURA 1975).
Das Verhalten der "S-Sulfocysteinsynthase" und Cysteinsynthase von Chlorella ist bei der Aufreinigung sehr unterschiedlich, zumal die erstere Aktivität nach der Trennung an DEAE-Sephacel nicht wiedergefunden werden kann. Bei Salmonella ist die S-Sulfocysteinsynthase mit der Cysteinsynthase B (NAKAMURA et al. 1983), bei Pseudomonas mit der O-Acetylsulfhydrolase II (CHAMBERS und TRUDINGER 1971) assoziiert, und zeigt gleiches Elutionsverhalten auf der Sephadex-G-100-Säule. Auch bei Chromatium (HENSEL und TRÜPER 1981) und bei Rhodospirillum (HENSEL und TRÜPER 1983) besitzt die O-Acetylsulfhydrylase II eine S-Sulfocysteinsynthaseaktivität, die an der DEAE-Sephacel-Säule nicht abgetrennt werden kann und gleiche Eigenschaften besitzt. Bei all diesen Arbeiten wurde aber nie die Thiosulfatreduktase mitgemessen, so daß eine Kopplung,wie wir sie bei Chlorella nachgewiesen haben (3.7.4.2), nicht ausgeschlossen werden kann.
Wie die eigenen Ergebnisse zeigen (Tab. 43),handelt es sich bei der im Rohextrakt gemessenen "S-Sulfocysteinsynthase" um die Kopplung von Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase, wobei in Gegenwart von DTE Thiosulfat und O-Acetylserin zu L-Cystein umgesetzt wird. Dies wird besonders eindrucksvoll durch die Bilanzierung mit den aufgereinigten Enzymen (Tab. 34) bestätigt, da bei der Reduzierung der Cysteinsynthase das gebildete Cystein in gleicher Weise abnimmt, wie freies Sulfid gemessen werden kann.Somit wird die Frage nach der Stellung der Thiosulfatreduktase bei der assimilatorischen Sulfatreduktion zum Cystein hin aufgeworfen.

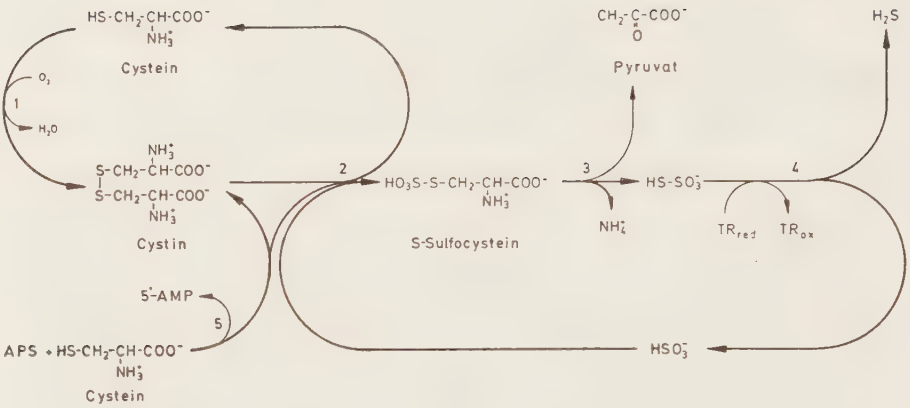
Wie aus den Versuchen A_{27} bis A_{32} und C_{33} bis C_{38} (Tab. 43) hervorgeht, wird die Aktivität des einen Enzyms durch das Protein des anderen Enzyms gehemmt, was auf eine interne Bindung von Sulfid schließen läßt. Da freies Sulfid ein artifizielles Substrat sein dürfte (SCHMIDT 1973) und der Gehalt von freiem und gebundenem Sulfid bei Chlorella zu 2 µM bestimmt wurde (SCHMIDT 1973, 1977b, SCHMIDT et al. 1974), dürfte die Thiosulfatreduktase zwischen Thiosulfonatreduktase und Cysteinsynthase stehen (SCHMIDT et al. 1984).
Das Carrier-Sulfid wird dabei aber nicht freigesetzt (Schema A), sondern direkt auf eine reduzierte Thiolgruppe der Thiosulfatreduktase übertragen, wobei sich ein Persulfid bildet. Bei der Reaktion von O-Acetylserin mit dem Pyridoxalphosphat der Cysteinsynthase wird Acetat abgespalten und ein α-Aminoacrylat an das Pyridoxalphosphat gebunden, welches das Sulfid aus dem Persulfid der Thiosulfatreduktase übernehmen kann und somit Cystein bildet (78).



Dabei wird die Thiosulfatreduktase oxidiert, die in einem 2-Elektronenschritt zur aktiven Dithiol-Form reduziert werden muß. Bei Chlorella scheint das, bei der Lichtreaktion der Photosynthese gebildete, reduzierte Thioredoxin die nötigen Elektronen zu liefern (SCHMIDT et al. 1984).

Thiosulfat ist somit nur ein artifizielles Substrat der Thiosulfatreduktase. Da schon früher die Beteiligung einer Rhodanese bei der assimilatorischen Sulfatreduktion beobachtet wurde (SCHMIDT et al. 1974), dürfte es sich um die Thiosulfatreduktase handeln, da diese auch Rhodanese-Eigenschaften besitzt (SCHMIDT et al. 1984). Die in Tab. 43 vorgestellten Ergebnisse sind nicht ganz eindeutig, da die angereicherte Cysteinsynthase noch Spuren von S-Sulfocysteinsynthase enthält, die auf das Vorliegen von Restmengen an Thiosulfatreduktase, bei der es sich wegen des hohen Molekulargewichtes um das Isoenzym IIIa handeln dürfte (SCHMIDT et al. 1984), zurückgeführt werden könnten.

Neben dieser Stellung der Thiosulfatreduktase bei der Cysteinbildung, bieten sich noch andere Funktionen an. Bei der assimilatorischen Sulfatreduktion kann Cystein mit Adenosin-5'-phosphosulfat zu Cystin und Sulfit reagieren (Schema H1 ;SCHMIDT 1976), die ihrerseits in einer chemischen Reaktion S-Sulfocystein und Cystein bilden (SEGEL und JOHNSON 1963). Diese Reaktion (H2) soll auch von der Mercaptopyruvatsulfotransferase aus Hühnerembryos ausgeführt werden können (CHAPEVILLE und FROMAGEOT 1957). Das Cystein wird mit Sauerstoff und der Cysteinoxidase , die für Chlorella (KRÄMER und SCHMIDT 1984) und Synechococcus (SCHMIDT und KRÄMER 1983) bekannt ist, wieder zu Cystin zurückgeführt (H3), welches einer erneuten Bildung von S-Sulfocystein zur Verfügung steht (H4). Das gebildete S-Sulfocystein könnte nun mit einer S-Sulfocysteinlyase zu Pyruvat, Ammoniumionen und Thiosulfat gespalten werden (H5). Diese Reaktion ist bisher der Cystinlyase zugeschrieben worden, die bei Rhodopseudomonas (WIDER de XIFERA et al. 1976), der Kohlrübe (MAZELIS et al. 1982, MAZELIS et al. 1967) und bei Kohl (TISHEL und MAZELIS 1966) S-Sulfocystein besser als L-Cystin umsetzen kann. Nur bei der Kohlrübe wurde auch eine Cystinlyase isoliert, die geringe Umsätze zeigt und zudem ß-Cystathionase-



Schema H : Die Stellung der Thiosulfatreduktase

1 = Cysteinoxidase; 2 = chemische Reaktion; 3 = Cystinlyase; 4 = Thiosulfatreduktase; 5 = APS-Sulfotransferase.

aktivität besitzen soll (ANDERSON und THOMPSON 1979). Es wurde versucht, diese S-Sulfocysteinlyase nach 2.5.12 nachzuweisen. Die besten Umsätze konnten für die Rübse (753 nmol Pyruvat/mg Protein/h) und für Rettich (211 nmol/mg/h) beobachtet werden. Aber auch Spinat (63 nmol/mg/h) und Chlorella (2,8 nmol/mg/h) enthalten diese Aktivität, die bei Chlorella durch Wachstum auf L-Cystin unter Standardbedingungen (2.1.1) noch um den Faktor 6,7 gesteigert werden konnte (19 nmol/mg/h).

Somit könnte Thiosulfat durch die Spaltung des Sulfocysteins entstanden sein. Es wird dann mit der Thiosulfatreduktase zu Schwefelwasserstoff und Sulfit gespalten, wobei das in der Photosynthese gebildete Thioredoxin oxidiert wird (SCHMIDT et al. 1984). Das Sulfit kann erneut mit Cystin zu Sulfocystein reagieren.

Es sei noch erwähnt, daß eine S-Alkylcysteinlyase bei Spinat (12,9 nmol/mg/h), Chlorella (22,9 nmol/mg/h), Bohne (57 nmol/mg/h), Rübse (42 nmol/mg/h), nicht aber bei Rettich vorhanden zu sein scheint, wie dies in dem Sulfocysteinlyasetest (2.5.12) mit S-Methyl-L-Cystein statt L-Sulfocystein als Substrat gezeigt wurde. Bei der Kohlrübe kann die Cystinlyase ebenfalls S-Methyl- und S-Äthyl-Cystein verwerten (ANDERSON und THOMPSON 1979). Eine S-Alkylcysteinlyase ist schon für Acacia und Albizzia (MAZELIS und FOWDEN 1973) beschrieben

Es sei abschließend aber erwähnt, daß beim Wachstum von Chlorella auf Methionin aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens von Thiosulfatreduktase, Cysteinsynthase und "Sulfocysteinsynthase" auf die Induktion einer S-Sulfocysteinsynthase geschlossen werden könnte (Tab. 25 ; 3.4.5.6).

4.0 G E S A M T D I S K U S S I O N

Im Folgenden werden die Diskussionsergebnisse der einzelnen Kapitel zusammengefaßt und in den Rahmen des gesamten Cysteinstoffwechsels von Pflanzen, speziell von Chlorella, gestellt. Um Wiederholungen zu vermeiden, werden nur die wichtigsten Aspekte diskutiert. Besteht der Wunsch, eine vertiefte Aufarbeitung der Ergebnisse zu erhalten, so muß auf die Einzeldiskussionen 3.2.3, 3.3.1.5, 3.3.4, 3.4.5, 3.5.5, 3.6.3 und 3.7.5 zurückgegriffen werden.

4.1 Regulation des Cysteinstoffwechsels

Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchungen war die noch immer ungenügend bekannte Regulation der Enzyme des Cysteinstoffwechsels. Dabei sind aber nicht nur die direkt beteiligten Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion, wie die Sulfatpermease, die ATP-Sulfurylase, die APS-Sulfotransferase, die Thiosulfonatreduktase und die Cysteinsynthase zu nennen, sondern auch die Pyrophosphatase, die APS-Sulfatase, die APS-Kinase, die Sulfitreduktase, die Thiosulfatreduktase, und die Serintransacetylase von Bedeutung.
Zudem können die O-Acetylserinlyase, die Cysteinoxidase, die Cysteinracemase, die Cystinlyase, die γ-Cystathionase sowie die Enzyme der Glutathion- und Proteinbiosynthase einen regulativen Einfluß haben.
Die drastischen Stoffwechseländerungen, die beim Licht-Dunkelwechsel erfolgen, lassen auf ein sehr universelles und schnelles Regulationsprinzip bei Pflanzen schließen. Auch die assimilatorische Sulfatreduktion und somit der Cysteinstoffwechsel werden vom Licht gesteuert, wobei dieses aber nicht direkt auf die Enzyme wirken kann. Diese Funktion dürfte Thioredoxin übernehmen, das durch die Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase mit dem Elektronenfluß des Photosystems 1 reduziert werden kann und somit lichtreguliert ist. Es stimuliert die Pyrophosphatase von Chlorella (SCHMIDT 1983), die APS-Kinase von Chlamydomonas (SCHWENN und SCHRIEK 1984) und die APS-Sulfotransferase, aber nur bei Chroococcidiopsis (SCHMIDT 1980) sowie die Thiosulfatreduktase von Chlorella (SCHMIDT et al. 1984).
Für den Cysteinstoffwechsel spielen aber auch noch zwei andere Regulationsprinzipien eine Rolle. Dabei wäre die Steuerung über den "energy charge", der

Zelle zu nennen, der im Dunkeln niedrig ist, was zu einer Hemmung der ATP-Sulfurylase bei Spinat (SCHWENN und DEPKA 1977) und der APS-Sulfotransferase bei Chlorella, Mais und Spinat (SCHMIDT 1975b) durch 5'-AMP führt.
Auch die Reduktion des carriergebundenen Sulfits zu Sulfid ist lichtabhängig, da Ferredoxin als Coenzym der Thiosulfonatreduktase bekannt ist, das durch die Elektronenkette der Photosynthese reduziert werden kann. Zudem ist eine lichtbedingte Enzymregulation durch pH-Veränderungen während der Photosynthese denkbar, da hier der pH-Wert von 7,1 nach 8,1 verschoben wird (HELDT et al. 1973) und somit näher den pH-Optima vieler Enzyme liegt.
Eine Regulation der Cysteinsynthase durch die beschriebenen Mechanismen konnte bisher nicht beobachtet werden. Thioredoxin hat keinen Einfluß auf dieses Enzym (eigene Ergebnisse, nicht näher dargestellt). Da die Oxidation des Cysteins mit der Cysteinoxidase als Gegenreaktion zur Stimulierung durch Thioredoxin angesehen wird, erscheint die Regulation der Cysteinsynthase durch Licht wenig sinnvoll. Dieses Enzym, das von Chlorella (KRÄMER und SCHMIDT 1984) und Synechococcus (SCHMIDT und KRÄMER 1983) bekannt ist, inaktiviert die lichtaktivierten Enzyme durch Oxidation der freien Thiolgruppen. So ließe sich der inaktivierende Einfluß von L-Cystein auf die Thiosulfonatreduktase von Chlorella (SCHMIDT 1973, SCHMIDT et al. 1974) erklären, während die in eigenen Untersuchungen beobachtete Aktivitätssteigerung der Thioredoxin-kontrollierten Thiosulfatreduktase bei Chlorella in vivo (Tab. 18) und in vitro (GAMON 1983) und bei Lemna (Tab. 21 und 22) dieser These widersprechen.
Die zentrale Rolle des Cysteins, die durch den Einfluß seiner Oxidation zu Cystin unterstrichen wird, und später genauer besprochen werden soll, ließ uns nach Regulationsprinzipien seiner Synthese suchen. Dabei ist die Cysteinsynthase als letztes Enzym der Synthesekette zum Cystein von besonderem Interesse. Im Folgenden werden nur die Grundprinzipien der Regulation zusammengefaßt, während eine detaillierte Diskussion bereits unter 3.7.5 erfolgte und dort nachgelesen werden kann.
In unseren Untersuchungen zeigt die Cysteinsynthase ein sehr unterschiedliches Verhalten, wie dies auch schon von der Literatur her bekannt war. Unter Standardbedingungen wird sie bei Chlorella (Tab. 18) und bei Lemna (Tab. 21 und 22) nicht durch L-Cystein reguliert, wie dies schon von Tabak (SMITH 1972, 1980, BRUNOLD 1981), Klee (NG und ANDERSON 1978a) und Weizen (ASCANO und NICHOLAS 1977) bekannt war. Eine Inaktivierung konnten wir dagegen unter Kurzzeitbedingungen (Tab. 20) und in vitro (Abb. 46) bei Chlorella und bei Lemna (Tab. 21 und 22 mit 0,6 mM L-Cystein) beobachten. L-Cystein hemmt auch das Enzym bei der Bohne (SMITH und THOMPSON 1971, 1972) und in vitro bei

Weizen (ASCANO und NICHOLAS 1977) und Klee (NG und ANDERSON 1978a). Nur phototrophe Bakterien werden stets durch Cystein reprimiert (HENSEL 1979, HENSEL und TRÜPER 1976, 1983, IMHOFF et al. 1981).

Da Cystein die Cysteinsynthase bei Chlorella zumindest in vivo nicht reguliert, könnte O-Acetylserin diese Funktion übernehmen. Das Enzym wird bei Bakterien, wie Salmonella (KREDICH 1971, HULANICKA et al. 1979; BAPTIST und KREDICH 1977) und Escherichia coli (JONES-MORTIMER et al. 1968) durch O-Acetylserin induziert, während die Cysteinsynthase bei Chlorella in vivo nicht gesteigert wird, wie dies auch von höheren Pflanzen bekannt ist. Somit muß diese Regulationsmöglichkeit während der Phylogenie schon vor den Grünalgen verloren gegangen sein. Es soll in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben, daß für Tabak (SMITH 1980) und Kürbis (RENNENBERG 1983) doch eine Induktion vermutet wird, da O-Acetylserin bei Tabak eine intrazelluläre Konzentration von 120 nmol/mg Frischgewicht erreicht (SMITH 1977).

Auch Schwefelwasserstoff, dessen Wirkung bei Chlorella nicht untersucht wurde, könnte für die Regulation von großer Bedeutung sein. So scheint die Cysteinsynthase von Lemna (BRUNOLD und SCHMIDT 1976), Tabak (BRUNOLD 1981) und Bohne (WYSS und BRUNOLD 1980) nicht reguliert zu sein, wenngleich bei der Bohne unter in vitro Bedingungen (WYSS und BRUNOLD 1980, BERTAGNOLLI und WEDDING 1977) und bei Rhodopseudomonas globiformis (HENSEL 1979, HENSEL und TRÜPER 1976, 1983, IMHOFF et al. 1983) eine Hemmung gefunden wurde. Unsere Untersuchungen mit Chlorella, die keine Regulation der Cysteinsynthase durch stoffwechselrelevante Verbindungen beobachteten, könnten durch die Proteasestabilität der Cysteinsynthase, wie sie von der Bohne beschrieben ist (SCHMUTZ et al. 1983), erklärt werden.

Nachdem nun die Cysteinsynthase als wichtiges regulierbares Enzym ausscheidet, muß die Regulation der assimilatorischen Sulfatreduktion bei anderen daran beteiligten Enzymen erfolgen, da unter Schwefelmangel viele Enzyme erhöhte Aktivitäten aufweisen (Tab. 18). L-Cystein als Endprodukt dieses Syntheseweges beeinflußt vor allem die Sulfatpermease und APS-Sulfotransferase negativ. Ein hoher Cysteinpool kann sich dann in der Zelle aufbauen, wenn dem Medium Sulfid oder Cystein zugesetzt war, wie dies für Lemna in eigenen Untersuchungen, die die Ergebnisse von BRUNOLD und ERISMANN (1974) und BRUNOLD und SCHMIDT (1978) bestätigen, und für Tabak (RENNENBERG 1981) gezeigt wurde. SMITH (1975) führt aber die Hemmung der Sulfatpermease bei Chlorella (VALLEE und JEANJEAN 1968b), Tabak (HART und FILNER 1969, SMITH 1975, 1980) Lemna (BRUNOLD und SCHMIDT 1978) und bei der Kartoffel (MAGGIONI und RENOSTO 1977) nicht auf Cystein selbst, sondern auf das Oxidationsprodukt des Cysteinabbaues, Sulfat, zurück.

Auch die ATP-Sulfurylase kann sowohl durch L-Cystein bei Tabak (REUVENY und FILNER 1977) negativ beeinflußt werden, wie andererseits eine Stimulierung bei Lemna (BRUNOLD und SCHMIDT 1978), Tomate, Kohlrübe, Salat und Lemna gibba (ELLIS 1969) auch in vitro und bei Rhodopseudomonas globiformis (IMHOFF et al. 1981) beobachtet wurde. Nur Anacystis (SAWHNEY und NICHOLAS 1976) und Euglena (BRUNOLD und SCHIFF 1976) bleiben unbeeinflußt. Die APS-Sulfotransferase wird bei Tabak (TRINITY et al. 1980, JENNI et al. 1980), Lemna (BRUNOLD und SCHMIDT 1978) und der Bohne (WYSS und BRUNOLD 1979) gehemmt, während sie bei Euglena (BRUNOLD und SCHIFF 1976) unbeeinflußt bleibt und bei Rhodopseudomonas globiformis sogar induziert wird (IMHOFF et al. 1981). Die eigenen Untersuchungen mit Chlorella zeigen, wenngleich nur die Summe der ATP-Sulfurylase und APS-Sulfotransferase als Sulfataktivierung bestimmt wurde, keine Regulation unter Standardbedinungen, doch müssen hier erst getrennte Enzymmessungen genauere Aufschlüsse erbringen.

Schwefelwasserstoff, ein wichtiges Zwischenprodukt der assimilatorischen Sulfatreduktion wirkt bevorzugt auf die Sulfatpermease, die ATP-Sulfurylase und die APS-Sulfotransferase. So hemmt Schwefelwasserstoff die Sulfatpermease von Lemna (BRUNOLD und ERISMANN 1974), Spinat (SPEDDING et al. 1980a), Tabak (SMITH 1976) und Chlorella (VALLEE und JEANJEAN 1968a) und die ATP-Sulfurylase von Rhodopseudomonas globiformis (COOPER 1980), während dieses Enzym bei Lemna nicht reguliert wird (BRUNOLD und SCHMIDT 1976, BRUNOLD 1981). Besonders die APS-Sulfotransferase scheint von Sulfid bei Lemna (BRUNOLD und SCHMIDT 1976, VAN ARB und BRUNOLD 1980) und Bohne (WYSS und BRUNOLD 1979) gehemmt zu sein, wobei dies über einen Enzymabbau geschehen soll.

Da Schwefelwasserstoff auch als Reaktionsprodukt des Cysteinabbaues entstehen kann, sollte eine Regulation der L-Cysteindesulfhydrase erwartet werden, wie sie aber nur bei Rhodospeudomonas (NEUTZLING und TRÜPER 1982) beobachtet wurde. Wenn schon L-Cystein nicht die Cysteinsynthase reguliert, so könnte es aber seinen Abbau beeinflussen. Unsere Untersuchungen zeigen unter Kurzzeitbedingungen (Tab. 20) bei Chlorella und bei Lemna (Tab. 21 und 22) eine Induktion des Enzyms, wie sie bei Tabak (HARRINGTON und SMITH 1980), Gurke und Kürbis (RENNENBERG 1983b) vermutet wurde. Da die L-Cysteindesulfhydrase, zumindest bei Chlorella, nach unseren Versuchsergebnissen eine Seitenaktivität der Cysteinsynthase ist, führt deren Induktion zu einem vermehreten Cysteinabbau über den oxidativen internen Schwefelzyklus, auf den unter 4.3 näher eingegangen werden soll und der zur Sulfatbildung führt.

Sulfat hat auch regulative Eigenschaften und wirkt hauptsächlich auf die Sulfatpermease bei Tabak (SMITH 1975, 1976, 1980, 1981), Chlorella (VALLEE und JEANJEAN 1968a), Bohne (WYSS und BRUNOLD 1980) und Weizen (JENSEN und KÖNIG

1982) negativ, wie auch die ATP-Sulfurylase von Tabak (REUVENY und FILNER 1977) und die APS-Sulfotransferase der Bohne (WYSS und BRUNOLD 1980, UTHEG und WESTLEY 1979) reprimiert werden.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Regulation der assimilatorischen Sulfatreduktion nicht an der Cysteinsynthase, sondern an den ersten Enzymen dieser Reduktionskette erfolgt, was auch sinnvoll erscheint, um so einen unnötigen ATP- und Elektronenverbrauch zu vermeiden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Regulation stellt auch die Interaktion von Stickstoff- und Schwefelstoffwechsel dar. Das Verhältnis von S zu N beträgt in der Regel 1/25. Die Zelle ist daher bestrebt, dieses Verhältnis aufrecht zu erhalten. Deshalb findet eine Coregulation beider Reduktionswege statt. Dazu sind 2 Möglichkeiten in der Zelle verwirklicht:

1. Eine indirekte Regulation des N-Stoffwechsels ist bei lichtregulierten Enzymen über das Thioredoxinsystem möglich. Bei Chlorella wird die Glutaminsynthetase und die Glutamatsynthetase (GOGAT) (TISCHNER und SCHMIDT 1982) und bei Synechococcus die Glutaminsynthetase und die Isocitratdehydrogenase durch Thioredoxin aktiviert (TISCHNER und SCHMIDT 1984). Durch die Inaktivierung des Thioredoxin mit dem Cysteinoxydasesystem ist die Dunkelhemmung und Lichtaktivierung indirekt mit dem Schwefelstoffwechsel verbunden.
2. Beide Stoffwechsel haben auch einen direkten gegenseitigen Einfluß, der zur Hemmung der eigenen Reduktionsenzyme wie der ATP-Sulfurylase oder der Nitratreduktase durch die Endprodukte Cystein und Glutamin und die Stimulierung beider Enzyme durch Nitrat und Sulfat (REUVENY et al. 1980) führt.

Bei N-Mangel wird die Sulfatpermease von Tabak (SMITH 1980), die APS-Sulfotransferase von Lemna (BRUNOLD und SUTER 1983) und die Cysteinsynthase von Tabak (SMITH 1980) reprimiert. Bei S-Mangel ist die Nitratreduktase von Tabak reprimiert (TRINITY et al. 1980, REUVENY et al. 1980). Die Enzyme der Sulfatreduktion sind dagegen bei S-Mangel aktiviert, wie dies für die Sulfatpermease von Anacystis (JEANJEAN und BRODA 1977) und Tabak (SMITH 1980) die ATP-Sulfurylase von Tabak (TRINITY et al. 1980, REUVENY und FILNER 1977) und Mais (PASSERA und GHISI 1982, SCHMUTZ und BRUNOLD 1982) und die APS-Sulfotransferase von Tabak (TRINITY et al. 1980), Lemna (BRUNOLD und SCHMIDT 1978) und Mais (SCHMUTZ und BRUNOLD 1984) beschrieben wurde. Die Sulfataktivierung zeigte bei Chlorella bei Schwefelmangel unter Standardbedingungen ebenfalls eine Stimulierung (Tab. 18).

Ebenso bewirkt S-Mangel bei Chlorella unter Standardbedingungen für die Thiosulfatreduktase, Cysteinsynthase und L-Cysteindesulfhydrase (Tab. 18) gesteigerte Enzymaktivitäten. Dies wurde für die Thiosulfatreduktase bei

Chlorella (GAMON 1983), für die Cysteinsynthase bei Tabak (SMITH 1980, TRINITY et al. 1980), Mais (PASSERA und GHISI 1982), Bohne (SMITH und THOMPSON 1971, 1972) und Synechococcus (Tab. 19) und für die L-Cysteindesulfhydrase von Tabak (HARRINGTON und SMITH 1980) beschrieben. Nur die Serintransacetylase der Bohne ist nicht reguliert (SMITH 1972). S-Mangel führt zu erhöhten Asparagin- und Glutaminwerten, da die Proteinbiosynthese gehemmt ist (KLAPHECK et al. 1982). Während andere schwefelhaltige Verbindungen keinen Einfluß auf die Glutamin- und Glutamatsynthetase haben sollen (RHODES und TRINITY 1979), reduziert Nitrat die Sulfatpermeaseaktivitäten bei Karotten (CRAM 1982) und Tabak (SMITH 1976) und steigert die APS-Sulfotransferase bei Tabak (TRINITY et al. 1979). Bei Lemna ist dieses Enzym unverändert (BRUNOLD und SUTER 1983). Ammoniumionen stimulieren dagegen die Sulfatpermease (BRUNOLD und ERISMANN 1974) und die APS-Sulfotransferase (BRUNOLD und SUTER 1983) bei Lemna, wie dies auch für Glutamin und Asparagin beobachtet wurde. L-Cystein kann wie Nitrat die Nitratreduktase nach S-Mangel wieder dereprimieren (TRINITY et al. 1980), womit der von REUVENY et al. (1980) vorgeschlagene Regulationsmechanismus bewiesen wäre.

4.2 Lokalisation der Enzyme des intrazellulären Schwefelzyklus

Neben den gerade beschriebenen Regulationsprinzipien kann auch die Kompartimentierung einen großen Einfluß auf den Schwefelflux in der Zelle haben, auf den jetzt näher eingegangen werden soll.

Die Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion bei höheren Pflanzen scheinen vorwiegend im Chloroplasten lokalisiert zu sein. Dies sind die ATP-Sulfurylase bei Spinat (SCHMIDT 1968), Catharanthus (URLAUB und JANKOWSKY 1982, SCHWENN et al. 1976), Mais, Weizen (SCHMUTZ und BRUNOLD 1984) und Hafer (GERWICK et al. 1980), die APS-Sulfotransferase bei Spinat (SCHMIDT 1976), Catharanthus (SCHWENN et al. 1979, URLAUB und JANKOWSKY 1982), Mais und Weizen (SCHMUTZ und BRUNOLD 1984) und die Thiosulfonatreduktase bei Spinat (SCHWENN und HENNIES 1974), Erbse (NG und ANDERSON 1979) und Hafer (GERWICK und BLACK 1979). Die Cysteinsynthase findet sich im Chloroplasten bei Spinat (FANKHAUSER und BRUNOLD 1980), Mais (SCHMUTZ und BRUNOLD 1982), aber auch im Cytoplasma bei Spinat (Isoenzym I, WYSS und BRUNOLD 1980; FANKHAUSER und BRUNOLD 1979), Catharanthus (URLAUB und JANKOWSKI 1982), Phaseolus vulgaris (Isoenzym I, WYSS und BRUNOLD 1980; SMITH 1972; SCHMUTZ et al. 1983), Raps (MASADA et al. 1975) und Weizen (ASCANO und NICHOLAS 1976). Ebenso ließ sich die Sulfitreduktase bei Spinat (MAYER 1967) und Mais (SCHMUTZ und BRUNOLD 1984) im Chloroplasten nachweisen.

Bei C_4-Pflanzen sind die Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion in den Bündelscheidenchloroplasten vollständig vorhanden. In den Mesophyllchloroplasten finden sich nur die Sulfitreduktase und die Cysteinsynthase (SCHMUTZ und BRUNOLD 1984).

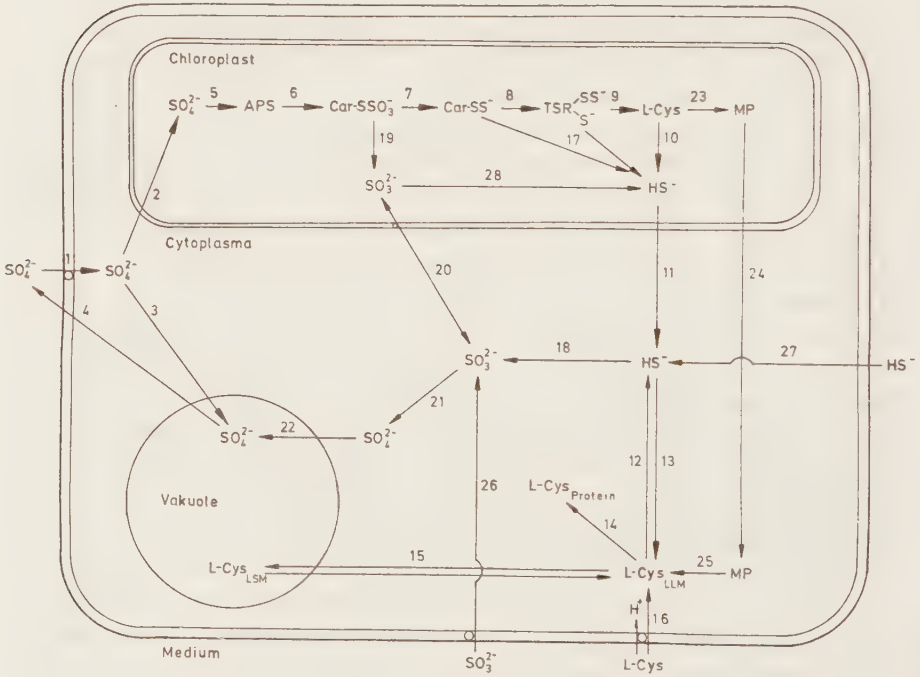
Nur Euglena (BRUNOLD und SCHIFF 1976) und Pilze (PIENIAZEK et al. 1973) scheinen die Sulfatreduktion auch in den Mitochondrien durchführen zu können. In den Mitochondrien wurde zudem die Serintransacetylase der Bohne (SMITH 1972) und die ß-Cyanoalaninsynthetase bei Lupine (HENRICKSON und CONN 1969), Lotus FLOSS et al. 1965) Hirse, Gerste, Flachs und Bohne (FLOSS et al. 1965) gefunden. Die APS-Kinase scheint ein cytoplasmatisches Enzym bei Catharanthus zu sein (URLAUB und JANKOWSKY 1982).

Aus diesen Ergebnissen wurde ein vereinfachtes Schema I zusammengestellt. Die Sulfationen des Mediums, Ausgangssubstrat der Sulfatreduktion können aktiv mit der Sulfatpermease ins Cytoplasma aufgenommen werden (I 1),von wo ein geringer Teil in den Chloroplasten (I 2) zur assimilatorischen Sulfatreduktion (I 5 - 9) transportiert wird. Da die Sulfatreduktion ausschließlich im Chloroplasten ablaufen soll, wobei L-Cystein gebildet wird, und andererseits Cystein für die Proteinbiosynthese z.B. im Cytoplasma benötigt wird, kann ein Schwefeltransport aus dem Chloroplasten hinaus erwartet werden.

Ein direkter Transport von Cystein erscheint wenig wahrscheinlich, da Organellmembranen für diese Verbindung undurchlässig sein sollen (KATUUNA et al. 1968).

Eine Verbindung zwischen Cysteinpool im Chloroplasten und im Cytoplasma könnte Schwefelwasserstoff darstellen, der mit der L-Cysteindesulfhydrase, nach unseren Ergebnissen einer Seitenaktivität der Cysteinsynthase, bei Chlorella (3.7.5.2) im Chloroplasten (I 10) und Cytoplasma (I 12) freigesetzt wird. Er diffundiert als gelöstes Gas durch die Chloroplastenmembran (I 11) (SPEDDING et al. 1980a) und wird mit der cytoplasmatischen Cysteinsynthase zu dem leicht metabolisierbaren Cysteinpool (LLM) umgesetzt (I 13). Schwefelwasserstoff, der im Chloroplasten auch aus dem Carrier oder der Thiosulfatreduktase freigesetzt werden kann (I 17),hemmt sowohl die Mn^{2+}-abhängige Wasserspaltung und somit das Photosystem II, wie er auch eine chemische Reduktion der oxidierten Elektronenakzeptoren bewirkt, die mit Sauerstoff zur Bildung von Wasserstoffperoxid, einem weiteren Zellgift, führt (FILNER und RENNENBERG 1981).Somit kann man der cytoplastidären Cysteinsynthase eine Rolle zur Entgiftung von Schwefelwasserstoff durch die Bildung von Cystein zuschreiben.

Der Cysteinpool der Zelle beträgt für Lemna beim Wachstum auf (1 mM) Sulfat, (20 µmol) Cystein (GIOVANELLI et al. 1980) und auf (0,5 mM) L-Cystein im Medium bezogen auf den gesamten Wasserraum der Zelle 1,2 mM und bezogen auf das Cytoplasma 13 mM Cystein (BRUNOLD und SCHMIDT 1978). L-Cystein wird auch durch einen Protonencotransport in das Cytoplasma gebracht (I 16). Im Cytoplasma gibt es neben dem großen Anteil an proteingebundenem Cystein (I 14) einen relativ großen Anteil von schlecht metabolisierbarem löslichen Cystein (LSM) (I 15), welches reversibel in der Vakuole gespeichert sein dürfte und



Schema I : Lokalisation der am intrazellulären Schwefelzyklus beteiligten Enzyme

im Gleichgewicht mit leicht metabolisierbaren löslichem Cystein (LLM) steht GIOVANELLI et al. 1978). Bei pH 8,0 sind z.B. 1,7 mM Cystein im Cytoplasma und 0,9 mM in der Vakuole verteilt. das leicht metabolisierbare Cystein ist Ausgangsprodukt für die Methionin-, Glutathion- und Proteinbiosynthese (GIOVANELLI et al. 1978).

Da die Diffusion von Schwefelwasserstoff durch die Chloroplastenmembran angezweifelt wurde (NG und ANDERSON 1978a),wäre auch ein Mercaptopyruvat-shuttle denkbar (I 24). Cystein wird mit einer Aminosäureoxidase oder Aminosäuretransaminase zu Mercaptopyruvat umgesetzt (I 23), welches mit einem Shuttle die Chloroplastenmembran passiert und im Cytoplasma wieder zu Cystein transaminiert werden kann (I25). Wegen der geringen Strukturunterschiede zu einem Pyruvatcarrier sollte Mercaptopyruvat mit diesem transportiert werden. Mercaptopyruvat könnte aber auch mit der Mercaptopyruvatsulfotransferase, die jetzt bei Chlorella gefunden wurde (I 26) (SCHMIDT 1984), Schwefelwasserstoff freisetzen ohne selbst die Membran passieren zu müssen.

Wenn man den Ergebnissen einiger Autoren Glauben schenken würde, die die Cysteinsynthase nur im Cytoplasma gefunden hatten, so müßte ein Transport von O-Acetylserin durch die Chloroplastenmembran erfolgen. Dies erscheint nach den Untersuchungen von NG und ANDERSON (1978a) wenig wahrscheinlich, so daß die negativen Befunde für den Chloroplasten eher auf die Labilität der Cysteinsynthase zurückzuführen ist, die ein Fehlen dieses Enzyms im Chloroplasten vortäuscht.

Durch die Oxidation des Cysteins zum Sulfat (I 12, 18, 21) kann die Zelle den Cysteinpool regulieren. Über 85 % des Sulfates werden bei Tabak in der Vakuole gespeichert, wobei dieser Vorgang durch hohe pH-Werte gesteigert (I 3) (SMITH 1981) und von L-Cystein an der Tonoplastenmembran kontrolliert wird (CRAM 1983a,b). Der Efflux (I 4) aus der Vakuole über das Cytoplasma zum Medium erfolgt passiv. Der Sulfatgehalt beträgt für die Vakuole von Tabak 3,8 mmol und das Cytoplasma 2,6 mmol bei pH 8,0 (SMITH 1981).

Es muß noch erwähnt werden, daß Sulfit in den Chloroplasten über einen Phosphattranslokator transportiert werden könnte (I 20), wo es über die Sulfitreduktase zu Schwefelwasserstoff reduziert werden kann (I 28) (HAMPP und ZIEGLER 1977).

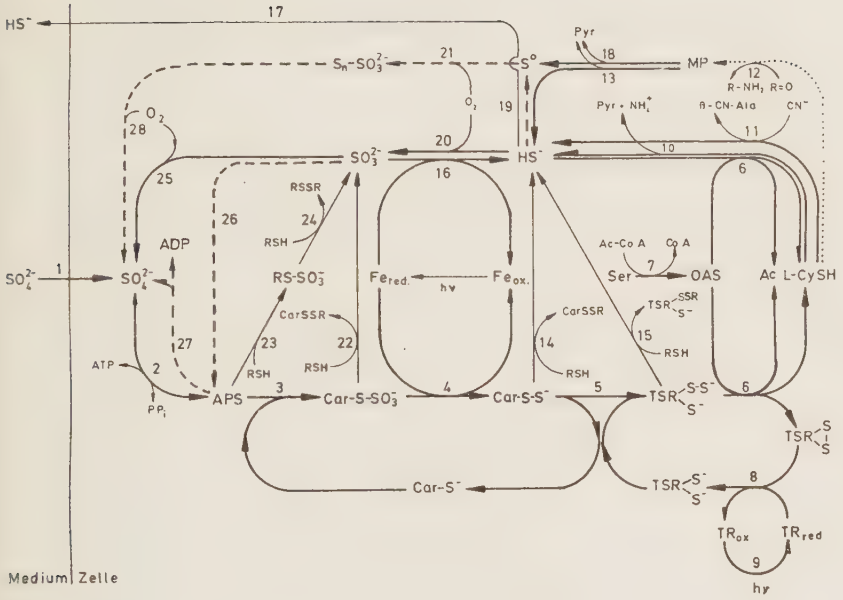
Abschließend sei noch auf den Widerspruch hingewiesen, daß die ß-Cyanoalaninsynthetase bisher nur in Mitochondrien gefunden wurde und somit nicht mit der Cysteinsynthase identisch sein kann. Es wäre aber durchaus denkbar, daß die Cysteinsynthase, deren Seitenaktivität die ß-Cyanoalaninsynthetase ist, in Mitochondrien die Entgiftung des Cyanids übernimmt, wobei aber nicht L-Cystein, sondern Mercaptopyruvat als Substrat fungiert, da dieses die Membran

passieren könnte. Ein solcher Funktionswechsel wurde von der Sulfitreduktase bei Mais diskutiert,die in den Bündelscheidenchloroplasten Sulfit reduziert, in den Mesophyllchloroplasten dagegen die Nitritreduktion ausführen soll (SCHMUTZ und BRUNOLD 1984).

4.3 Der intrazelluläre Schwefelzyklus

Im Folgenden soll der intrazelluläre Schwefelzyklus vorgestellt werden, wobei zum einen die eigenen das Schema A ergänzenden Ergebnisse zur assimilatorischen Sulfatreduktion wie auch die oxidativen Reaktionen besprochen werden (Schema K).

Nach unseren Versuchen kann man die Thiosulfatreduktase, deren Stellung im Schwefelstoffwechsel bei Pflanzen bisher ungeklärt war, als lichtreguliertes Enzym zwischen die Thiosulfonatreduktase (K 4) und Cysteinsynthase (K 6) einordnen. Sie(K 5) übernimmt das von der Thiosulfonatreduktase gebundene Carriersulfid und gibt es,ohne es freizusetzen, an die Cysteinsynthase ab, was mit O-Acetyl-L-Serin als Akzeptor zur Cysteinbildung führt. Dies konnte durch die Kopplung einer gereinigten Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase aus Chlorella gezeigt werden, wobei L-Cystein entsteht. Für ein enzymgebundenes Sulfid spricht die Tatsache, daß die Einzelaktivitäten durch die Anwesenheit des anderen Enzyms, dessen Substrate aber fehlten, deutlich reduziert werden. Somit scheint Thiosulfat nur ein artifizielles und carriergebundenes Sulfid das eigentliche Substrat der Thiosulfatreduktase zu sein. Der Befund, daß die Thiosulfatreduktase auch eine Rhodanese ist(SCHMIDT et al. 1984),ist ein weiterer Beweis für die von uns vorgeschlagene Stellung dieses Enzyms, da schon ABRAMS in der Arbeit von SCHMIDT et. al. (1974) eine Beteiligung einer Rhodanese an der assimilatorischen Sulfatreduktion beobachtete.
Die bei dieser Reaktion entstandene oxidierte Thiosulfatreduktase muß wieder reduziert werden. Als Elektronendonator soll Thioredoxin fungieren, welches die Thiosulfatreduktaseaktivität steigert (SCHMIDT et al. 1984). Während somit wieder eine aktive Thiosulfatreduktase dem nächsten Carriersulfid zur Verfügung steht, wird das oxidierte Thioredoxin mit der Ferredoxin-Thioredoxinreduktase reduziert. Indirekt stammen dabei die 2 Elektronen aus der Photosynthese, was einen weiteren lichtabhängigen Schritt bei der assimilatorischen Sulfatreduktion bedeutet, wie ihn BRUNOLD und ERISMANN (1975) für Lemna und RENNENBERG et al. (1982) für die Gurke gefordert haben.
An der Schwefelwasserstoffbildung können mehrere Enzyme beteiligt sein, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen. Die eine Gruppe , die aus der Mercaptopyruvatsulfotransferase und der Thiosulfatreduktase besteht, verfügt über reaktive reduzierte Thiolgruppen, die durch Thioredoxin und Ferredoxin aktiviert werden können, die andere Gruppe umfaßt die Cysteinsynthase und ihre Seiten-



Schema K : Intrazellulärer Schwefelzyklus

1) Sulfatpermease; 2) ATP-Sulfurylase; 3) APS-Sulfotransferase; 4) Thiosulfonatreduktase; 5) Thiosulfatreduktase; 6) Cysteinsynthase; 7) Serintransacetylase; 8) Thiosulfatreduktase-Thioredoxin-Reduktase; 9) Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase; 10) L-Cysteindesulfhydrase; 11) ß-Cyanoalaninsynthetase; 12) L-Cysteintransaminase; 13) Mercaptopyruvatsulfotransferase; 14) Abspaltung von Schwefelwasserstoff aus Carriersulfid; 15) Abspaltung von Schwefelwasserstoff aus Thiosulfatreduktase-gebundenem Persulfid; 16) Sulfitreduktase; 17) Abgabe von Schwefelwasserstoff; 18) Mercaptopyruvatsulfotransferase; 19) Sulfidoxidation; 20) Sulfidoxidase; 21) wie 20); 22) Abspaltung von Sulfit; 23) Abspaltung von Sulfit aus APS; 24) Freisetzen des thiolgebundenen Sulfids; 25) Sulfitoxidase; 26) APS-Reduktase; 27) ADP-Sulfurylase; 28) Sulfitoxidase.

——— in Pflanzen gefundene Enzyme - - - in Mikroorganismen gefundene Enzyme

..... in Tieren gefundene Enzyme

aktivitäten wie die L-Cysteindesulfhydrase, die ß-Cyanoalaninsynthetase, die Austauschreaktionen sowie die Cysteintransaminase, die alle Pyridoxalphosphat als Coenzym enthalten. Da die Bildung des Schwefelwasserstoffes z.T. licht- und nur z.T. pyridoxalphosphat-abhängig ist, müssen bei dieser Reaktion mehrere der genannten Reaktionswege beteiligt sein (RENNENBERG et al. 1982).

Da Aminooxyessigsäure einerseits in vitro die L-Cysteindesulfhydrase (K 10), die als Seitenaktivität der Cysteinsynthase Cystein zu Schwefelwasserstoff, Pyruvat und Ammiumionen abbaut (SEKIYA et al. 1982b; 3.7.5.2), hemmt (Tab. 42), andererseits in vivo die Schwefelwasserstoffabgabe stimuliert, mißt RENNENBERG et al. (1982) dieser Enzymaktivität nur eine geringe Rolle ein. Auch die ß-Cyanoalaninsynthetase, eine weitere Seitenaktivität der Cysteinsynthase, setzt Schwefelwasserstoff frei (K11). Es sei noch erwähnt, daß Schwefelwasserstoff mit der D-Cysteindesulfhydrase freigesetzt werden kann (SCHMIDT 1982). Als Alternative bietet sich die Reaktionskette mit einer Aminosäureoxidase (K 12), deren Nachweis bisher für Algen und höhere Pflanzen aussteht, und der Mercaptopyruvatsulfotransferase, die Schwefelwasserstoff freisetzt (SCHMIDT 1984), an. Eine weitere Möglichkeit zu seiner Bildung besteht darin, daß Sulfid bei Gurke und Kürbis aus dem Carrier-gebundenem Sulfid (K14) oder dem Thiosulfatreduktase-gebundenem Sulfid (K 15) freigesetzt wird. Da diese Schritte nicht durch Aminooxyessigsäure gehemmt werden, dürften sie von der Thiosulfatreduktase oder der Rhodanese ausgeführt werden. Eine direkte Abspaltung aus der Thiosulfatreduktase scheint besonders beim Fehlen des Akzeptors O-Acetylserin stattzufinden, da RENNENBERG (1983a) unter O-Acetylserin-Mangel erhöhte Schwefelwasserstoffabgabe beobachtete.

Sulfid kann aber auch über die Sulfitreduktase mit Ferredoxin als Coenzym gebildet werden, wobei dieser Syntheseweg bei Chlorella nur eine geringe Bedeutung zu haben scheint (K 16; SCHMIDT et al. 1974).

Nicht nur Schwefelwasserstoff sondern auch elementarer Schwefel könnte bei der Mercaptopyruvatsulfotransferase entstehen (K 18; SCHMIDT 1984), da Chlorella beim Wachstum auf Cyst(e)inestern elementaren Schwefel bildet, der von uns nachgewiesen werden konnte. S^o kann auch bei der anoxigenen Photosynthese (K19; GARLICK et al. 1977) oder mit Cytochromen aus Schwefelwasserstoff (FISCHER 1977) gebildet werden.

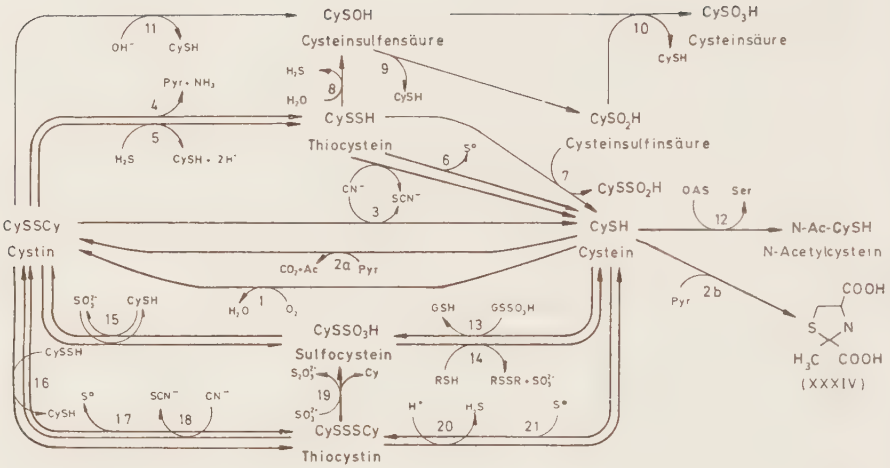
Das Sulfid kann entweder als Schwefelwasserstoff entweichen (K 17) oder zum Sulfat oxidiert werden, wie dies für den Umsatz von L-Cystein zum Sulfat bei Lemna (BRUNOLD und ERISMANN 1975; DATKO und MUDD 1984) und Tabak (SMITH 1975, 1980) mit markiertem Cystein gezeigt wurde. Dabei tritt stets freies oder gebundenes Sulfit als Zwischenprodukt auf. Freies Sulfit soll in der Rückreaktion der Sulfitreduktase, die Sirohäm als Coenzym besitzt, aus Sulfid gebildet werden (K20), wie sie bei Chromatium befunden wurde (SCHEDEL 1977). Das gleiche Enzym oxidiert auch elementaren Schwefel zu Polysulphanen (S_n-SO_3^-) (K21; SCHEDEL 1977). Da bei der Extraktion des elementaren Schwefels aus Chlorella auch eine hydrophile Fraktion, die Ladungen trägt, auftritt,

könnte es sich dabei um Polysulphane handeln (Tab. 26).
Freies Sulfit kann aber auch direkt mit Dithiolen aus dem Carrierpersulfit (K 22; TSANG und SCHIFF 1976) und nach der Reaktion von APS mit 1,3- und 1,4-Dithiolen und der APS-Sulfotransferase über ein Thiolpersulfit (K 23) und die anschließende chemische Reaktion mit einem weiteren Thiol (K.24) freigesetzt werden.
Während also Pflanzen die Oxidation vom Sulfid zum Sulfat an den freien Ionen durchführen, oxidieren tierische Systeme organisch-gebundenes Sulfid vom Cystein über die Cysteinsulfinsäure und Cysteinsäure zum Taurin oder über Sulfopyruvat zum Sulfat (JACOBSEN und SMITH 1968), womit sie sich grundlegend von Pflanzen unterscheiden.
Die Oxidation von freiem oder gebundenem Sulfit zum Sulfat erfolgt mit der Sulfitoxidase, die bei Tieren Pteridin (JOHNSON et al. 1980) und Molybdän (KESSLER und RAJAGOPADAN 1972) als Cofaktoren enthält.
Phototrophe Bakterien nutzen die Oxidation von Sulfit mit 5'-AMP und der APS-Reduktase zur Bildung des energiereichen APS (K.26), welches mit der ADP-Sulfurylase (K 27) Sulfat und ADP freisetzt, wobei letzteres mit der Adenylat-Kinase ATP bilden kann (TRÜPER 1981).
Auch in Abwesenheit der APS-Reduktase können phototrophe Bakterien wie Chromatium Sulfat durch eine Sulfitoxidase bilden (K.25 ;TRÜPER 1981).

Bei Pflanzen sind nur wenige Sulfitoxidasen (K 25) untersucht worden, die zudem widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Das Enzym soll im Chloroplasten von Spinat (ASADA und KISO 1972) oder den Mitochondrien der Erbse (BALLANTYNE 1977) und Hafer (TAGER und RAUTANEN 1956) lokalisiert sein. Eine genaue Charakterisierung dieses Enzms bei Pflanzen steht noch aus.
In gleicher Weise sollte die Oxidation der Polysulphane zum Sulfat erfolgen (K 28). An dieser Reaktion dürfte ein Superoxidanion beteiligt sein (ASADA und KISO 1973). Eine genaue Charakterisierung dieses Enzyms bei Pflanzen steht noch aus.
Somit ergibt sich ein intrazellulärer Schwefelzyklus, der aus der Reduktion des Sulfates über APS und carriergebundene Zwischenstufen zum Cystein führt, das über Sulfid und Sulfit zum Sulfat oxidiert werden kann.

4.4 Der Cysteinstoffwechsel bei Algen und höheren Pflanzen

Zum Abschluß soll nun ein Überblick über den gesamten Cysteinstoffwechsel gegeben werden (Schema M und N). Auf diese Weise können die eigenen Ergebnisse die bisher bekannten Enzymreaktionen ergänzen oder bestätigen.
Bevor jedoch auf einige ausgesuchte Aspekte näher eingegangen werden kann, sollen im Schema L alle bisher bekannten chemischen Reaktionen um das Cystein dargestellt werden.



Schema L : Chemische Reaktionen des Cysteins

1)	$2CySH + 1/2\ O_2$	$CySSCy + H_2O$; Katalysator Cu^{2+}	(CAVALLINI et al. 1969)
2a)	$2CySH$ + Pyruvat	$CySSCy + CO_2$ + Acetat ; pH 7,4	(CAVALLINI 1951)
2b)	CySH + Pyruvat	2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure + H_2O	(CAVALLINI 1951)
3)	CySSCy + HCN	CySH + CySCN ; CySCN ⟶ 2-Aminothiazolidin-4-carbonsäure (25) pH alkalisch : (AKOPYAN et al. 1975); pH sauer : (SULLIVAN et al. 1942)	
4a)	CySSCy	$CySSH + NH_3$ + Pyruvat ; $Ca(OH)_2$;	(DANN et al. 1957)
4b)	CySSCy	$CySSH + NH_3$ + Pyruvat ; Pyridoxalphosphat + Cu^{2+}	(CAVALLINI et al. 1960)
5)	CySSCy + H_2S	$CySSH + 2\ H^+ + CyS^-$; NaOH	(RAO und GORIN 1959)
6)	CySSH	$CySH + S^o$; pH 7,8 ; langsam;	(SZCZEPKOWSKI und WOOD 1967)
7)	CySSH + $CySO_2H$	$CySSO_2H + CySH$; pH 8 – 9 ;	(CAVALLINI et al. 1960)
8)	CySSH + H_2O	$CySOH + H_2S$; Katalysator Me^{2+};	(CAVALLINI et al. 1960)
9)	2 CySOH	$CySH + CySO_2H$; Disproportionierung ;	(CAVALLINI et al. 1960)
10)	CySOH + $CySO_2H$	$CySO_3H + CySH$	(SHINOHARA und KILIPATRICK 1934)
11)	CySSCy + OH^-	CySOH + CySH ; NaOH ;	(SCHOBERL und HORNUNG 1930)
12)	CySH + OAS	N-Acetyl-CySH + Serin ; neutral ;	(BECKER et al. 1969)
13)	CySH + $GSSO_3H$	$CySSO_3H$ + GSH ;	(WOODIN und SEGEL 1968)
14)	$CySSO_3H$ + 2 RSH	CySH + SO_3^{2-} + RSSR ;	(NAKAMURA und TAMURA 1975)
15)	CySSCy + SO_3^{2-}	CySH + $CySSO_3H$;	(SEGEL und JOHNSON 1963)
		Rückreaktion :	(SZCZEPOWSKI und WOOD 1967)
16)	CySSCy + CySSH	CySH + CySSSCy ;	(SZCZEPOWSKI und WODD 1967)
17)	CySSSCy	S^o + CySSCy ;	(SZCZEPOWSKI und WOOD 1967)
18)	CySSSCy + CN^-	SCN^- + CySSCy ;	(FLETCHER und ROBSON 1963)
19)	CySSSCy + $2SO_3^{2-}$	$S_2O_3^{2-}$ + CySH + $CySSO_3H$;	(FLETCHER und ROBSON 1963)
20)	CySSSCy + 4 H^+	2 CySH + H_2S ;	(FLETCHER und ROBSON 1963)
21)	CySH + S^o	CySSSCy ; sauer	(FLETCHER und ROBSON 1963)

Ihre Kenntnis kann bei der Betrachtung von Enzymdaten von großem Nutzen sein, da somit Interpretationsfehler aufgrund chemischer Reaktionen berücksichtigt werden. Die Reaktionsgleichungen sind in der Legende einzeln dargestellt. Bis auf die Reaktionen L 21 und 22 finden alle Umsätze im alkalischen Milieu statt, so daß sie bei vielen Enzymversuchen beachtet werden müssen.
Bei unseren Versuchen ist besonders die Reaktion (L 1) von Bedeutung, die Cystein in Gegenwart von Kupfer-(II)-ionen zu Cystin oxidiert. Auch die Cyanolyse (L 3) spielt bei der Bestimmung der Substratspezifität der ß-Cyanoalaninsynthetase (3.7.2.6) eine große Rolle, da chemisch Cyanocystein (68) entsteht, welches ohne Enzym zu 2-Aminothiazolidin-4-carbonsäure (XXV) oder mit weiterem Cyanid und Enzym zu ß-Cyanoalanin reagieren kann (69). Für die Cystinlyase ist die Reaktion (L 6) wichtig, da so das Thiocystein zu elementarem Schwefel reduziert wird. Eine besondere Beachtung verdient die Reaktion (L 14), wenn man S-Sulfocystein nachweisen will, da ein DTE-Zusatz diese Verbindung zerstört. Die Gleichung (L 15) wird zur Synthese von S-Sulfocystein eingesetzt (SEGEL und JOHNSON 1963).
Abschließend werden die biochemischen und chemischen Reaktionen vorgestellt, die am Cystein- und Cystinstoffwechsel (Schema M und N) beteiligt sind. Dabei sollen die eigenen Ergebnisse mit den aus der Literatur bekannten Reaktionswegen zu einem Gesamtschema zusammengefügt werden.
Die Cysteinbiosynthese erfolgt bei Algen und Pflanzen über die Cysteinsynthase (M 2), die auch in dieser Arbeit bei Chlorella angereichert und charakterisiert wurde (3.7). Als Substrat dieses Enzyms fungiert hauptsächlich O-Acetyl-L-Serin, das mit der Serintransacetylase (M 1) aus Serin und Acetyl-Coenzym A gebildet wird. Als zweites Substrat kann entweder freier Schwefelwasserstoff oder gebundenes Sulfid verwendet werden. Nach unseren Kopplungsversuchen mit der Thiosulfatreduktase und der Cysteinsynthase scheint die Thiosulfatreduktase das carriergebundene Sulfid zu übernehmen und an die Cysteinsynthase weiter zu geben (77). Eine Cysteinsynthase ohne die aktivierte Zwischenstufe O-Acetylserin von Serin (M 3) aus, spielt bei Chlorella kaum eine Rolle (1,2 % von O-Acetylserin). Obwohl auch Phosphoserin ein schlechtes Substrat ist (1,8 %), kann es als Sulfidakzeptor fungieren, da seine Konzentration von 2,7 µM (SCHMIDT 1973) der von gebundenem Sulfid (2 µM) fast gleich ist. Zudem kann O-Acetylserin während der Photosynthese, bei der sich der pH-Wert von 7,1 nach 8,1 im Stroma, wo die Cysteinsynthase lokalisiert ist, verändert (HELDT et al. 1973), zu N-Acetylserin umgelagert werden (FLAVIN und SLAUGHTER 1965), welches nicht als Substrat dient.

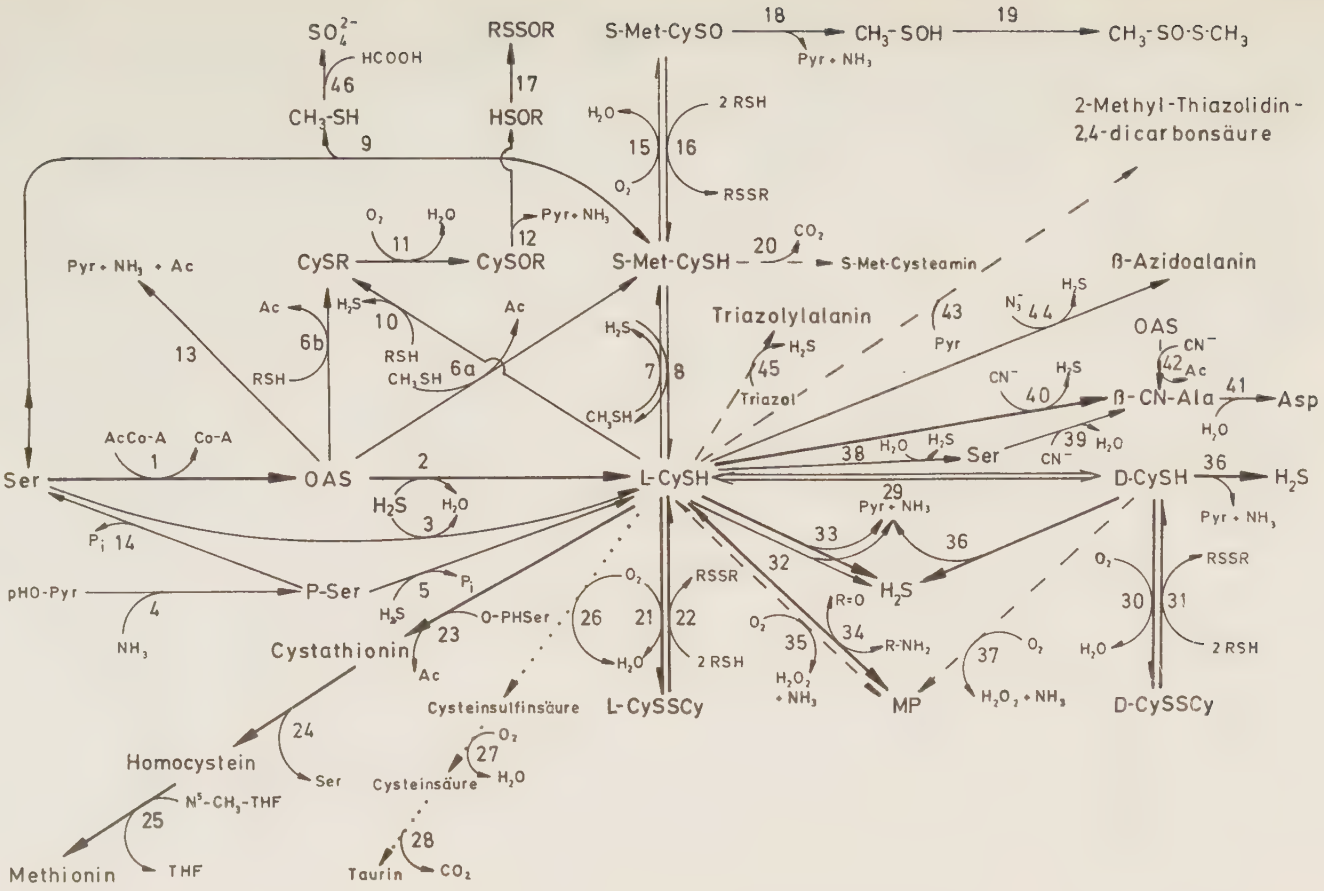
Schema M : Der Cysteinstoffwechsel

1) Serintransacetylase	(EC. 2.3.1.30)	Raps	; (NGO und SHARGOOL 1974)
2) Cysteinsynthase	(EC. 4.2.99.9)	Chlorella	; (SCHMIDT 1977b)
3) Serinsulfhydrase	(EC. 4.2.1.22)	Spinat	; (BRÜGGEMANN et al. 1962)
4) Phosphoserin-Aminotransferase	(EC. 2.6.1.52)	Erbse	; (CHEUNG et al. 1968b)
5) Phosphoserinsulfhydrolase		Chlorella	; (SCHMIDT 1977b)
6) Austauschreaktion a)		Spinat	; (GIOVANELLI und MUDD 1968)
b)		Allium	; (GRANROTH und SARNESTO 1974)
7) Austauschreaktion (Seitenreaktion der Cysteinsynthase)		Chlorella	siehe Tab. 41
8) Demethylierung	indir. Nachweis	Apfel	; (BAUR und YANG 1972)
9) Austauschreaktion		Zwiebel	; (GRANROTH 1970)
10) Austauschreaktion		Spinat	; (GIOVANELLI und MUDD 1968)
11) Oxidation		Zwiebel	; (GRANROTH 1970)
12) S-Alkylcysteinlyase (= Alliinase)	(EC. 4.4.1.4)	Broccoli	; (MAZELIS 1963)
13) O-Acetylserinlyase		Broccoli	; (MAZELIS und FOWDEN 1972)
14) Phosphoserinphosphatase	(EC. 3.1.3.3)	Spinat	; (LARSSON und ALBERTSSON 1979)
15) Oxidation		Rettich	; (ARNOLD und THOMPSON 1972)
16) Reduktion		Kohlrube	; (DONEY und THOMPSON 1966)
17) S-Alkylcysteinsulfoxidlyase	(EC. 4.4.1.4)	siehe 12)	
18) Lyase		Kohl	; (HALL und SMITH 1983)
19) Oxidation		Kohl	; (HALL und SMITH 1983)
20) S-Alkylcysteindecarboxylase		Hefe	; (MAW und COYNE 1968)
21) Cysteinoxidase		Chlorella	; (KRAMER und SCHMIDT 1984)
22) Cystinreduktase	(EC. 1.6.1.4)	Erbse	; (HATCH und TURNER 1969 a,b)
23) Cystathionin-γ-synthetase		Chlorella	; (GIOVANELLI et al. 1978)
24) ß-Cystathionase		Chlorella	; (GIOVANELLI et al. 1978)
25) Methioninsynthase	(EC. 2.1.1.14)	Erbse	; (CLADDININ und COSSINS 1974)
26) Cysteindioxygenase	(EC. 1.13.11.20)	vermutlich in Pflanzen; Tiere : (JACOBSEN und SMITH 1968)	
27) Oxidation		Tiere	; (JACOBSEN und SMITH 1968)
28) Cysteinsäuredecarboxylase		Tiere	; (JACOBSEN und SMITH 1968)
29) Cysteinracemase		Lemna	indir. Nachweis siehe 3.6.2.3
		Tabak	; (MIURA und MILLIS 1971)
30) Cysteinoxidase		Chlorella	; (KRAMER und SCHMIDT 1984)
31) Cystinreduktase	siehe 22)		
32) L-Cystinlyase	(EC. 4.2.1.15)	Raps	; (HALL und SMITH 1983) ?
33) L-Cysteindesulfhydrase	(EC. 4.4.1.1)	Tabak	; (HARRINGTON und SMITH 1980)
34) L-Cysteintransaminase	(EC. 2.6.1.3)	Bohne	; (FOREST und WIGHTMAN 1972)
35) Aminosäureoxidase		Escherichia coli	; (MEISTER et al. 1954)
36) D-Cysteindesulfhydrase		Chlorella	; (SCHMIDT und ERDLE 1983)
37) Aminosäureoxidase		Escherichia coli	; (MEISTER et al. 1954)
38) Serinsulfhydrase	(EC. 4.4.1.1)	Spinat	; (BRÜGGEMANN et al. 1962)
39) ß-Cyanoalaninsynthetase	(EC. 4.4.1.9)	Lotus	; (FLOSS et al. 1965)
40) ß-Cyanoalaninsynthetase	(EC 4.4.1.9)	Chlorella	; (FOWDEN und BELL 1965)
41) ß-Cyanoalaninnitrilase	(EC. 4.2.1.65)	Lupine	; (CASTRIC et al. 1972)
42) ß-Cyanoalaninsynthetase	(EC. 4.4.1.9)	Bacillus megaterium	; (CASTRIC und CONN 1971)
43) L-Cysteindesulfhydrase	(EC. 4.4.1.1)	Salmonella	; (KREDICH et al. 1973)
44) Cysteinsynthase	(EC. 4.2.99.9)	Gerste	; (ROSICHAN et al. 1983)
45) Triazolylase		Salmonella	; (KREDICH et al. 1975)
46) Methanthiollyase		Bohne	; (DONEY und THOMPSON 1971)

——— in Pflanzen gefundene Enzyme - - - in Microorganismen gefundene Enzyme

..... aus tierischen Organismen bekannte Enzyme; ß-CN-Ala = ß-Cyanoalanin; S-Met-CySH = S-Methylcystein; S-Met-CySO = S-Methylcysteinsulfoxid; CySR = S-Alkylcystein; CySOR = S-Alkylcysteinsulfoxid; ASP = Asparaginsäure; pHO-Pyr = P-Hydroxypyruvat.

Schema M : Der Cysteinstoffwechsel



Phosphoserin wird über die Phosphoserinaminotransferase (M 4) gebildet und mit der Phosphoserin-Phosphatase (M 14) metabolisiert. Eine Regulation der Cysteinsynthase könnte auch über dieses Enzym oder die O-Acetylserinlyase (M 13) erfolgen.

Die Bildung von Cysteinthioäthern erfolgt über Austauschreaktionen (M 7, M 10) mit Methanthiol oder homologen Alkylthiolen und Cystein selbst (M 7) oder O-Acetylserin (M 6a,b) oder Serin (M 9). Die Cysteinsynthase von Chlorella führt auch die Rückreaktion von M 10 und M 7 aus. Die Thioäther können auch zu S-Alkyl-Cysteinsulfoxid oxidiert werden (M 12, 15), die besonders bei der Zwiebel (GRANROTH 1970) zu den oxidierten Disulfiden metabolisiert werden. Eine Oxidation von Methanthiol zu Sulfat und Ameisensäure (M 46) wurde bisher nur bei der Bohne beobachtet. Methanthiol scheint meist wieder refixiert zu werden, da kaum eine Methanthiolfreisetzung beobachtet wurde (SEKIYA et al. 1982b).

Die Synthese des Methionins, einem weiteren Thioäther, erfolgt bei Pflanzen über Cystathionin (M 23 - 25), während Tiere nur in der umgekehrten Richtung Cystein bilden können.

Auch die Oxidation von Cystein zum Taurin hin, muß in Pflanzen stattfinden (M 26 - 28), da Cysteinsäure und Taurin in Pflanzen gefunden wurden (JACOBSEN und SMITH 1968).

Der Abbau von Cystein war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit, da eine Regulation des Cysteinstoffwechsels über den Abbau vermutet wurde (SCHMIDT und ERDLE 1983). Obwohl bei Chlorella eine L-Cysteindesulfhydrase (M 33) angereichert werden konnte (3.7.1), handelt es sich nicht um ein eigenes Protein, sondern um die Seitenaktivität der Cysteinsynthase, wie dies von uns gezeigt werden konnte (3.7.5.3). Bei dieser Aktivität kann auch mit einem weiteren Cystein durch Reaktion am enzymgebundenen α-Aminoacrylat die 2-Methyl-Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure entstehen (M 43).

Auch die Bildung von ß-Cyanoalanin muß bei Chlorella der Cysteinsynthase zugeschrieben werden (3.7.5.3), während die ß-Cyanoalaninsynthetase auch als eigenes Enzym bei anderen Pflanzen angereichert wurde (HENRICKSON und CONN 1969). Die Bildung von ß-Cyanoalanin erfolgte auch über Serin (M 40) oder O-Acetylserin (M 42), wenngleich diese Synthesewege bei Pflanzen kaum beobachtet wurden. ß-Cyanoalanin wird oft zu Asparagin umgesetzt und somit dem Stickstoffstoffwechsel zugeführt (M 41), was zur Entgiftung des Cyanids führt. Es muß offen bleiben, ob die Cysteinsynthase von Chlorella auch die Reaktionen der Triazolylase (M 45) und der ß-Azidoalaninsynthase (M 44) durchführt.

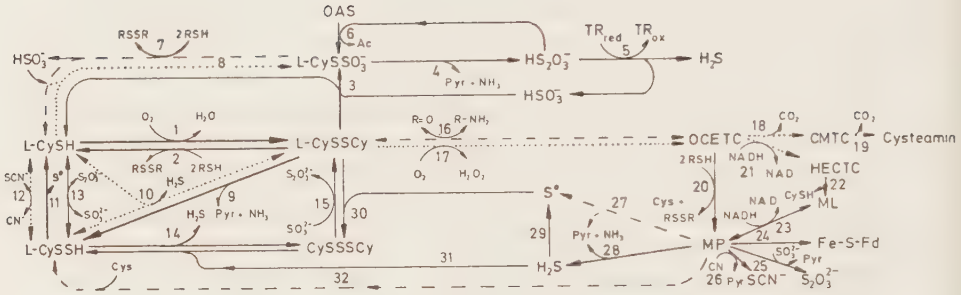
Neben dem L-Cysteinabbau konnte bei Chlorella auch ein D-Cysteinabbau mit der D-Cysteindesulfhydrase (SCHMIDT und ERDLE 1983) beobachtet werden (M 36). Dieses Enzym wurde auch in dieser Arbeit teilgereinigt und zur Bestimmung der Stereospezifität von Cystein eingesetzt.
Aus den eigenen in vivo Ergebnissen von Lemna, die beim Wachstum auf L-Cystein Gaitonde-positive Verbindungen bildet (3.6), wurde auch D-Cystein ermittelt, so daß eine Racemisierung von L- zu D-Cystein stattgefunden haben muß (M 29). Dieser indirekte Nachweis deutet eine Verbindung zwischen L- und D-Cysteinstoffwechsel an, deren Regulation für den Cysteinmetabolismus wichtig sein kann (SCHMIDT und ERDLE 1983). Es könnte sich dabei um ein Protein, wie es bei Tabak für die Racemisierung von L- und D-Tryptophan (MIURA und MILLIS 1971) gefordert wird, oder zwei stereospezifische Transaminasen (M 34), handeln, wobei Mercaptopyruvat als Zwischenprodukt auftreten könnte.
Wie aus Tab. 45 hervorgeht, scheint Chlorella L- und D-Cystein mit Aminosäureoxidasen metabolisieren zu können (M 35).

Tab. 45 : Aminosäureoxidasen aus Chlorella

Aminosäure	Sauerstoffverbrauch nach Abzug der Autoxidation (nmol O_2/min/mg Protein)
L-Cystein	0,24
D-Cystein	0,32
Cysteamin	1,04
Taurin	0,08
L-Cystin	0,00

Das Vorkommen von Aminosäureoxidasen wurde nach 2.5.10 in einem Ansatz mit einem Endvolumen von 1ml an der Sauerstoffelektrode gemessen, der 100 µmol Tris-HCl pH 8,0 ; 40 µmol Aminosäure und 1,035 mg Protein eines Rohextraktes einer Sulfatnormalkultur enthielt.

Ob Mercaptopyruvat auch über eine Transaminase (M 34) gebildet werden kann, muß bisher offen bleiben. Da die Alge eine ß-Mercaptopyruvatsulfotransferase besitzt (SCHMIDT 1984), muß Mercaptopyruvat entweder vom Cystein oder vom Cystin (N 16, 17, 20) aus über eine Aminosäuretransaminase oder -oxidase (M 34,35) gebildet werden.
Cystin, als oxidierte Verbindung, ist Ausgangspunkt einiger Reaktionen, die in Schema N dargestellt sind. Die Oxidation vom Cystein zum Cystin (M 21, N 1) wird bei Chlorella mit der Cysteinoxidase (KRÄMER und SCHMIDT 1984) durchgeführt. Bei der Reduktion von Cystin zu Cystein kann $NADPH/H^+$ oder sogar Thioredoxin als Coenzym beteiligt sein. Die Bildung von S-Sulfocystein kann entweder auf chemischem Wege (N 3) oder mit der S-Sulfocysteinsynthase (N 6)



Schema N : Der Cystinstoffwechsel

1) Cysteinoxidase		Chlorella	; (KRAMER und SCHMIDT 1984)
2) Cystinreduktase	(EC. 1.6.1.4)	Erbse	; (HATCH und TURNER 1969b)
3) chemische Reaktion			; (SEGEL und JOHNSON 1963)
4) S-Sulfocysteinlyase (= Cystinlyase)		Kohlrube	; (MAZELIS et al. 1982)
5) Thiosulfatreduktase	(EC. 2.2.8.1.1)	Chlorella	; (SCHMIDT et al. 1984)
6) S-Sulfocysteinsynthase		Rhodopseudomonas	; (HENSEL und TRÜPER 1976)
7) chemische Reaktion (SEGEL und JOHNSON 1963)		Aspergillus	; (NAKAMURA und SATO 1963) mit NADH/H^+
8) Oxidation		Ratte	; (UBUKA et al. 1979)
9) L-Cystinlyase	(EC. 4.2.1.15)	Kohl	; (HALL und SMITH 1983)
10) Thiolspaltung		Tiere	; (CAVALLINI et al. 1962)
11) chemische Reaktion			; (CAVALLINI et al. 1960)
12) Rhodanese	(EC. 2.8.1.1)	Ratte	; (WENG et al. 1962)
13) chemische Reaktion			; (ANDERSON und THOMPSON 1979) Rhodanese ?
14) Cysteinoxidase	siehe 1)		
15) Rhodanese	(EC. 2.8.1.1)	Rhodopseudomonas	; (WIDER de XIFERA et al. 1976)
16) Cystinoxidase		Neurospora	; (BENDER und KREBS 1950)
17) Aminosäureoxidase		Ratte	; (UBUKA et al. 1983)
18) Decarboxylierung		Ratte	; (KOBAYASHI 1970)
19) Decarboxylierung	siehe 18)		
20) chemische Reaktion			
21) Lactatdehydrogenase	(EC 1.1.1.27)	Ratte	; (KOBAYASHI 1970)
22) Disulfidbildung		Ratte	; (UBUKA et al. 1983)
23) Lactatdehydrogenase	(EC. 1.1.1.27)	Ratte	; (UBUKA et al. 1975)
24) Bildung des Fe-S-Cluster des Ferredoxins		Spinat	; (VOLINI und ALEXANDER 1981)
25) Mercaptopyruvat-Sulfotransferase	(EC. 2.8.1.2)	Ratte	; (SÖRBO 1957b)
26) Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase			; (JARABAK und WESTLEY 1978)
27) Mercaptopyruvat-Sulfotransferase	(EC. 2.8.1.2)	Escherichia coli?	; (VACHEK und WOOD 1972)
28) Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase		Chlorella	; (SCHMIDT 1984)
29) anoxigene Photosynthese : Blaualgen (GARLICK et al. 1977); Schwefelgärung: Oscillatoria ? (SHILO et al.1979)			
30) Rhodanese	(EC. 2.8.1.1)	Rhodopseudomonas	; (WIDER de XIFERA et al. 1976)
31) chemische Reaktion	siehe L21)		
32) Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase		Escherichia coli?	; (VACHEK und WOOD 1972)

—— Enzyme in Pflanzen; - - - in Microorganismen und Pilzen; ····· in Tieren;
TR = Thioredoxin; OCETC = S-(2-oxo-2-carboxyäthylthio)-cystein; HECTC = S-(2-hydroxy-2-carboxyäthylthio)-cystein
CMTC = S-(carboxymethylthio)-cystein;ML = Mercaptolactat; Fe-S-Fd. = Schwefel-Eisen-Cluster des Ferrodoxins

erfolgen. Dieses Enzym ist nach unseren Versuchen aber bei Chlorella nicht vorhanden (3.7.5.4). Die Enzyme seiner Metabolisierung werden aber bei Chlorella gefunden, wobei die S-Sulfocysteinlyase nur im Rohextrakt gemessen wurde, während die Thiosulfatreduktase (N 5) nach der Aufreinigung aus vier Isoenzymen bestehen zu scheint (SCHMIDT et al. 1984).
Die Bildung von Thiocystein über eine Cystinlyase scheidet bei Chlorella aus, da diese Aktivität nur auf Cruciferen beschränkt zu sein scheint (HALL und SMITH 1983, APPELTAUER 1984). Das instabile Thiocystein kann chemisch (N 11) oder mit der Rhodanese, die bei Chlorella mit der Thiosulfatreduktase identisch ist (SCHMIDT et al. 1984), zu Cystein gespalten werden.
Das Vorkommen einer Mercaptopyruvatsulfotransferase und die Bildung von elementarem Schwefel (3.5) sind ein Indiz für die Reaktionskette (N 16, 17, 20, 27), wie sie bereits von KRAUSS et al. (1983) vorgeschlagen wurde.
Die dazu nötigen Enzyme müssen aber noch untersucht werden. Mercaptopyruvat kann sowohl für die Fe-S-Clusterbildung des Ferredoxins (N 24) aber auch zur Bildung von Thiosulfat oder Thiocyanat (N 25, 26) verwendet werden (SCHMIDT 1984).
Der sich beim Wachstum von Chlorella auf Cystein- und Cystinestern anhäufende elementare Schwefel kann durch eine Rhodanese mit der Bildung von Thiocystin (N 30) remobilisiert werden.
Wie die vorliegenden Schemata M und N zeigen, konnten bei Chlorella eine Vielzahl der beschriebenen Enzyme bereits beobachtet werden. Weiteren Arbeiten muß es vorbehalten bleiben, die noch fehlenden Enzyme für die Alge nachzuweisen.

5.0 Z U S A M M E N F A S S U N G

a) Die Grünalge Chlorella fusca 211-8b wächst auf einer Vielzahl von schwefelhaltigen Verbindungen, wie Mercaptiden, Thioäthern, Sulfatestern, Sulfin- und Sulfonsäuren als einziger Schwefelquelle. Gerade das gute Wachstum auf Ligninsulfonsäuren, die bei der Papierherstellung anfallen, und den Alkylsulfonsäuren, die Bestandteil von Waschmitteln sind, deutet auf eine Anwendungsmöglichkeit von Chlorella bei der Abwasserreinigung hin. Die vergleichenden Untersuchungen mit der Blaualge Synechococcus 6301 zeigen ein erheblich engeres Spektrum der metabolisierbaren Verbindungen.

b) Das Wachstum auf diesen Verbindungen führt zur Regulation einiger am Cysteinstoffwechsel beteiligter Enzyme. Als entscheidende Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion wurden die Sulfataktivierung. die aus der Summenaktivität der ATP-Sulfurylase und APS-Sulfotransferase besteht, sowie die Cysteinsynthase gemessen. Zudem untersuchte man den Cysteinabbau mit der ß-Cyanoalaninsynthetase, der L- und D-Cysteindesulfhydrase sowie die Thiosulfatreduktase und "S-Sulfocysteinsynthase". Als Beispiel des Einflusses auf den Stickstoffwechsel wählte man die Glutaminsynthetase. Die genannten Enzyme werden von vielen der eingesetzten Verbindungen negativ oder positiv beeinflußt. Mit Ausnahme der Glutaminsynthetase erhöht Schwefelmangel, der auch bei schlecht metabolisierbaren Verbindungen auftritt, alle untersuchten Enzyme, im Besonderen die Thiosulfatreduktase erheblich. Die Cysteinsynthase, ein Schlüsselenzym des Cysteinstoffwechsels, wird in vivo durch sein Endprodukt L-Cystein nicht gehemmt. O-Acetyl-L-Serin, ein Induktor bakterieller Cysteinsynthasen, bleibt ohne Wirkung, wie dies auch bei höheren Pflanzen beobachtet wurde. Es muß seine regulatorische Funktion phylogenetisch schon vor den Grünalgen verloren haben. Durch Cystein werden die Cysteindesulfhydrasen induziert.

c) Einige interessante Ergebnisse konnten aus den Nullwerten gewonnen werden. Man beobachtete bei Chlorella-Kulturen, die auf Cysteinäthylester gewachsen sind, eine starke nicht enzymatische Schwefelwasserstoffabgabe in Gegenwart von DTE. Dieses " gebundene Sulfid" besteht nach der Extraktion aus 3 Fraktionen, von denen eine nach Aufreinigung und Massenspektrometrie als elementarer Schwefel identifiziert wurde. Dies ist der erste Nachweis von elementarem Schwefel bei Grünalgen. Seine Funktion könnte die Speicherung von reduziertem Schwefel beim Überschwemmen der Zelle mit Cystein sein, der später wieder abgebaut wird, wie man dies in Schema D diskutiert. Dabei scheint die Mercaptopyruvatsulfotransferase eine wichtige Rolle zu spielen.

d) Beim Wachstum von Chlorella auf der Schwefelquellenkombination O-Acetylserin/ L-Cystein und von Lemna auf Cystein beobachtet man erhöhte Nullwerte bei der Cysteinsynthase. Aufgrund des chemischen Verhaltens dieser Substanz bei der

Aufreinigung und dem Nachweis mit dem sauren Ninhydrinreagenz dürfte es sich um Thiazolidinderivate handeln, die ebenfalls als Reaktionsprodukte der Cysteindesulfhydrase beobachtet werden.

e) Diese Untersuchungen zeigen deutlich, daß das verwendete Nachweisverfahren von CAITONDE (1967) erheblich unspezifischer als bisher angenommen ist und die mit ihm erhaltenen in vivo Ergebnisse kritisch überprüft werden sollten.
Die systematische Suche ergab, daß Cystein, S-Sulfocystein, die Cysteinester, S-Carbamoylcystein, N-Acetylcystein und Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure das typische Spektrum dieses Nachweises mit dem Absorptionsmaximum bei 560 nm aufweisen. Mit Cystathionin, Cystin und ß-Cyanoalanin z.B. traten anders gefärbte Reaktionsprodukte auf. Grund der Unspezifität ist die Hydrolyse der positiven Verbindungen mit dem sauren Reagenz zum Cystein hin. Der Cystein-Ninhydrin-Komplex ist nach seiner Aufreinigung labil und hat ein Molekulargewicht von 503 m/e. Dieses Ergebnis erlaubt die korrekte Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{560\ nm}$, der 1,65 x 10^6 cm^2 x mol^{-1} beträgt. Es wird ein vorläufiger Strukturvorschlag gemacht. Danach soll das Reaktionsprodukt (XIX) nach Abspalten der Carboxylgruppe entstehen, wobei sich insgesamt 3 Ninhydrinmoleküle an die Thiol- und Aminogruppe anlagern.

f) Das Molekulargewicht der aufgereinigten Cysteinsynthase beträgt 68 000D. Sie hat einen K_m-Wert bezüglich O-Acetyl-L-Serin von 6,6 mM und wird von L-Cystein (K_I 4,8 µM) kompetitiv gehemmt. Für Schwefelwasserstoff beträgt der K_m-Wert 1,42 mM. Phosphoserin kann auch als Sulfidakzeptor fungieren, wenngleich der Umsatz nur 1,8 % von dem mit O-Acetylserin beträgt. Die Produktanalyse zeigte eine stereospezifische Bildung von L-Cystein.
Die Cysteinsynthase von Chlorella ist ein multifunktionales Enzym, da ihm als Seitenaktivitäten die L-Cysteindesulfhydrase, ß-Cyanoalaninsynthetase und die Austauschreaktion mit S-Methylcystein zugeschrieben werden muß. Diese Enzymaktivitäten zeigten in vitro und in vivo ein fast identisches Verhalten. Der K_m-Wert der L-Cysteindesulfhydrase beträgt bezüglich L-Cystein 0,33 mM und zeigt eine Substrathemmung durch höhere Cysteinkonzentrationen. Auch die ß-Cyanoalaninsynthetase besitzt den gleichen K_m-Wert für dieses Substrat, während er für Cyanid 12,5 mM ist. Durch Hemmstoffversuche mit Hydroxylamin und Aminooxyessigsäure wird Pyridoxalphosphat als Coenzym nachgewiesen. Das bei der Reaktion auftretende α-Aminoacrylat ist für die Multifunktionalität der Cysteinsynthase verantwortlich, da es je nach Reaktant die beobachtete Enzymaktivität aufweist.

g) Die von phototrophen Bakterien bekannte S-Sulfocysteinsynthase kann bei Chlorella nicht nachgewiesen werden. Bei der "S-Sulfocysteinsynthaseaktivität" handelt es sich vielmehr bei Chlorella um die Kopplung einer Thiosulfatreduktase und einer Cysteinsynthase, wie dies mit teilgereinigten Enzymen gezeigt

wurde. Dabei entsteht aber nicht S-Sulfocystein, sondern Cystein, die beide mit dem üblichen sauren Ninhydrinreagenz, wie zuvor beschrieben, nicht unterschieden werden können. Diese Befunde konnten durch die Regulationsversuche bestätigt werden.

h) Es wird ein erweitertes Schema K zum intrazellulären Schwefelzyklus vorgestellt. In den eigenen Kopplungsversuchen von Thiosulfatreduktase und Cysteinsynthase scheint ein gebundenes Persulfid als Zwischenstufe aufzutreten, so daß Thiosulfat bzw. freier Schwefelwasserstoff nur artifizielle Substrate sein dürften. Daher sehen wir die eigentliche Funktion der Thiosulfatreduktase als Bindeglied zwischen Thiosulfonatreduktase und Cysteinsynthase bei der assimilatorischen Sulfatreduktion an. Das carriergebundene Sulfid der Thiosulfonatreduktase wird an die Thiosulfatreduktase weitergegeben, wo es als Persulfid gebunden, ohne Freisetzung als Schwefelwasserstoff, direkt an die Cysteinsynthase weitergegeben wird. Die oxidierte Thiosulfatreduktase kann durch Thioredoxin reduziert werden, so daß dieses Enzym über die Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase an die Lichtreaktion angekoppelt sein kann.

i) Elementarer Schwefel tritt als Zwischenprodukt des Cysteinabbaues auf, wobei er nach der Transaminierung oder Oxidation des Cysteins zu Mercaptopyruvat mit der Mercaptopyruvatsulfotransferase gebildet wird und anschließend zu Polysulphanen und Sulfat oxidiert werden kann.

k) Die Untersuchungen zur Multifunktionalität der Cysteinsynthase können auch das Vorliegen mehrer Isoenzyme, die im Chloroplasten und im Cytoplasma lokalisiert sind, sowie ihre Seitenaktivitäten erklären. Da die Chloroplastenmembran für Cystein impermeabel sein soll, könnte Schwefelwasserstoff den eigentlichen Schwefelcarrier darstellen. H_2S wird im Chloroplasten mit der L-Cysteindesulfhydrase, einer Seitenaktivität der Cysteinsynthase, gebildet, durch die Membran transportiert und anschließend mit der cytoplastidären Cysteinsynthase erneut zu Cystein umgesetzt. Auch Mercaptopyruvat könnte als Schwefelcarrier diskutiert werden, da es im Cytoplasma durch die Transaminase wieder zu Cystein umgewandelt werden kann.

l) In den Schemata M und N werden die eigenen Ergebnisse in den Rahmen des bisher bekannten Cystein- und Cystinstoffwechsels bei Pflanzen gestellt. Für einige der dort angesprochenen Enzyme liegen erste Ergebnisse über ihr Vorkommen bei Chlorella und Lemna vor. Besonderer Erwähnung bedarf eine Cysteinracemase, für deren Existenz die Bildung von D-Cystein beim Wachstum von Lemna auf L-Cystein spricht.

6.0 L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ABBOTT, E.H. und A.E. MARTELL : Pyridoxine and pyridoxal analogs. XIII. A nuclear magnetic resonance study of the condensation of polyfunctional amino acids with pyridoxal. J. Am. Chem. Soc. 92, 1754 - 1759 (1970)

ABDOLRASULNIA, R. und J.L. WOOD : Persulfide properties of thiocystine and related trisulfides. Bioorganic Chem. 9, 253 - 260 (1980)

AGRO, A.F.; I. MAVELLI; C. CANNELLA und G. FEDERICI : Activation of porcine heart mitochondrial malate dehydrogenase by zero valence sulfur and rhodanese. Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 553 - 560 (1976)

AKOPYAN, T.N.; A.E. BRAUNSTEIN und E.V. GORYACHENKOVA : Beta-cyanoalanine synthase : Purification and characterization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1617 - 1621 (1975)

AKOPYAN, T.N.; und E.V. GORYACHENKOVA : Purification and basic physicochemical properties of ß-cyanoalanine synthase. Biokhimiya 41, 746 - 753 (1976) (engl. Ausg. 906 - 914)

ALLEN, M.B. : Studies with Cyanidium caldarum, an anomalously pigmented chlorophyte. Arch. Mikrobiol. 32, 270 - 277 (1959)

ANDERSON, N.W. und J.F. THOMPSON : Cystine lyase: ß-cystathionase from turnip roots. Phytochem. 18, 1953 - 1958 (1979)

ANTHONI, U.; C. CHRISTOPHERSEN; J.O. MADSEN; S. WIUM-ANDERSEN und N. JACOBSEN: Biologically active sulphur compounds from the green alga Chara globularis. Phytochem. 19, 1228 - 1229 (1980)

APPELTAUER, R. : Catabolismus von D- und L-Cyst(e)in bei Brassica rapa. Staatsexamensarbeit, München (1984)

ARAD, S.M.; R.E. McGOWAN; M. FRIEDLANDER und A.E. RICHMOND : Alkalinity induced aggregate formation in Chlorella vulgaris. In "Algae biomass production and use." G. Shelef und C.J. Soeder (eds.), S. 402 -410 Elsevier, Amsterdam 1980

ARNOLD, W.N. und J.F. THOMPSON : The formation of (+) S-methyl-L-cysteine sulfoxide from S-methyl-L-cysteine in crucifers. Biochim. Biophys. Acta 57, 604 - 606 (1962)

ARNON, D.I. : Cooper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24, 1 - 15 (1949)

ASADO, K. und K. KISO : Initiation of aeobic oxidation of sulfite by illuminated spinach chloroplasts. Eur. J. Biochem. 33, 253 - 257 (1973)

ASCANO, A. und D.J.D. NICHOLAS : Purification and properties of O-acetyl-L-serine sulphydrylase from wheat leaves. Phytochem. 16, 889 - 899 (1977)

BACCANARI, D.P. : Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. Arch. Biochem. Biophys. 191, 351 - 357 (1978)

BAER, J.E. und M. CARMACK : The ultraviolet absorption spectra of aliphatic sulfides and polysulfides. J. Amer. Chem. Soc. 71, 1215 - 1218 (1949)

BAL, J.; R. MALESZKA; P. STEPIEN und J. CYBIS : Subcellular mislocation of cysteine synthase in a cysteine auxotroph of Aspergillus nidulans. FEBS Letters 58, 164 - 166 (1975)

BALL, C.R. : Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment: Relevance to protection against nitrogen mustards. Biochem. Pharmacology 15, 809 - 816 (1966)

BALLANTYNE, D.J. : Sulphite oxidation by mitochondria from green and ethiolated peas. Phytochem. 16, 49 - 50 (1977)

BAPTIST, E.W. und N.M. KREDICH : Regulation of L-cystine transport in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 131, 111 - 118 (1977)

BARTLETT, J.K. und D.A. SKOOG : Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons. Anal. Chem. 26, 1008 - 1011 (1954)

BARTLETT, P.D. und R.E. DAVIS : Reactions of elemental sulfur. II. The reaction of alkali cyanides with sulfur and some single-sulfur transfer reactions. J. Am. Chem. Soc. 80, 2513 - 2516 (1958)

BAUR, A.H. und S.F. YANG : Methionine metabolism in apple tissue in relation to ethylene biosynthesis. Phytochem. 11, 3207 - 3214 (1972)

BECKER, M.A. und G.M. TOMKINS : Pleiotropy in a cysteine-requiring mutant of Salmonella typhimurium resulting from altered protein-protein interaction. J. Biol. Chem. 244, 6023 - 6030 (1969)

BECKER, M.A.; N.M. KREDICH und G.M. TOMKINS : The purification and characterisation of O-acetyl-serine sulfhydrase-A from Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem. 244, 2418 - 2427 (1969)

BENDER, A.E. und H.A. KREBS : The oxidation of various synthetic α-aminoacids by mammalian D-amino-acid oxidases of Neurospora crassa. Biochem. J. 46, 210 - 219 (1950)

BENEDICT, R.C. und R.L. STEDMAN : Ellmans reagent: Interference in mercapto group determination, with special reference to cigarette smoke. Analyst 95, 296 - 301 (1970)

BERGER, E.A. und L.A. HEPPEL : A binding protein involved in the transport of cystine and diaminopimelic acid in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 247, 7684 - 7694 (1972)

BERGMAN, B. : Photorespiratory ammonium release by the cyanobacterium Anabaena cylindrica in the presence of methionine sulfoxime. Arch. Microbiol. 137, 21 - 25 (1984)

BERGMANN, L. und H. RENNENBERG : Efflux and production of glutathione in suspension cultures of Nicotiana tabacum. Z. Pflanzenphysiol. 88, 175 - 185 (1978)

BERTAGNOLLI, B.L. und R.T. WEDDING : Purification and initial kinetic characterization of different forms of O-acetylserine sulfhydrylase from seedlings of two spezies of Phaseolus. Plant Physiol. 60, 115 - 121 (1977)

BIEDLINGMAIER, S.; F. KRAUSS und A. SCHMIDT : Chemical cleavage of mercaptides by iron complexes and O_2 Eleventh international symposium on the organic chemistry of sulphur. C 020, Lindau 1984

BIRT, L.M. und F.J.R. HIRD : Kinetic aspects of the uptake of amino acids by carrot tissue. Biochem. J. 70, 286 - 292 (1958)

BLUMENTHAL, S.G.; H.R. HENRICKSON; Y.P. ABROL und E.E. CONN : Cyanide metabolism in higher plants. The biosynthesis of ß-cyanoalanine. J. Biol. Chem. 243, 5302 - 5307 (1968)

BRADFORD, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248 - 254 (1976)

BREUKER, E. : Die Verwertung von intrazellulärem Schwefel durch Chromatium vinosum im aeroben Licht- und Dunkelwechsel. Zbl. Bakt. Abt. II 118, 561 - 579 (1964)

BRÜGGEMANN, J.; K. SCHLOSSMANN; M. MARKENSCHLAGER und M. WALDSCHMIDT : Zur Frage des Vorkommens der Serinsulfhydrolase. Biochem. Z. 335, 392 - 399 (1962)

BRUNOLD, C. und K.H. ERISMANN : H_2S als Schwefelquelle bei Lemna minor L. : Einfluß auf das Wachstum, den Schwefelgehalt und die Sulfataufnahme. Experientia 30, 465 - 467 (1974)

BRUNOLD, C. und K.H. ERISMANN : H_2S as sulfur source in Lemna minor L. : II. Direct incorporation into cysteine and inhibition of sulfate assimilation. Experientia 15, 508 - 510 (1975)

BRUNOLD, C. und J.A. SCHIFF : Studies of sulfate utilization by algae. 15. Enzymes of assimilatory sulfate reduction in Euglena and their cellular localization. Plant Physiol. 57, 430 - 436 (1976)

BRUNOLD, C. und A. SCHMIDT : Regulation of adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase activity by H_2S in Lemna minor L. Planta 133, 85 - 88 (1976)

BRUNOLD, C. und A. SCHMIDT : Regulation of sulfate assimilation in plants. 7. Cysteine inactivation of adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase in Lemna minor L. Plant Physiol. 61, 342 - 347 (1978)

BRUNOLD, C. : Regulation of adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase in higher plants. In "Biology of inorganic nitrogen and sulfur" H. Bothe und A. Trebst (eds.) S. 352 - 358 Springer Verlag, Berlin, 1981

BRUNOLD, C.; J.-P. ZRYD und P. LAVACHY : Regulation of enzymes of assimilatory sulfate reduction in aerated cell suspension cultures of Nicotiana sylvestris. Plant Sci. Lett. 21, 167 - 174 (1981)

BRUNOLD, C. und M. SUTER : Regulation of extractable adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase activity by nitrogen nutrition in Lemna minor L. Experientia 39, 645 (1983)

BRYSK, M.M.; W.A. CORPE und L.V. HANKES : ß-Cyanoalanine formation by Chromobacterium violaceum. J. Bacteriol. 97, 322 - 327 (1969)

BUELL, M.V. und R.E. HANSEN : Reaction of pyridoxal-5'-phosphate with aminothiols. J. Am. Chem. Soc. 82, 6042 - 6049 (1960)

BURNELL, J.N. und F.R. WHATLEY : Sulphur metabolism in Paracoccus denitrificans. Purification, properties and regulation of serine transacetylase, O-acetylserine sulphydrylase and ß-cystathionase. Biochim. Biophys. Acta 481, 246 - 265 (1977)

CASTRIC, P.A. und E.E. CONN : Formation of ß-cyanoalanine by O-acetylserine sulfhydrylase. J. Bacteriol. 108, 132 - 136 (1971)

CASTRIC, P.A.; K.J.F. FARNDEN und E.E. CONN : Cyanide metabolism in higher plants. The formation of asparagine from ß-cyanoalanine. Arch. Biochem. Biophys. 152, 62 - 69 (1972)

CAVALLINI, D. : The coupled oxidation of pyruvate with glutathione and cysteine. Biochem. J. 49, 1 - 5 (1951)

CAVALLINI, D.; C. de MARCO und B. MONDOVI: Sur la synthèse de la thiotaurine. Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 1711-1715 (1958)

CAVALLINI, D.; C. de MARCO und B. MONDOVI : Cleavage of cystine by a pyridoxal model . Arch. Biochem. Biophys. 87, 281 - 288 (1960)

CAVALLINI, D.; B. MONDOVI; C. de MARCO und A. SCIOSCIA-SANTORO : The mechanism of desulphydration of cysteine. Enzymologia 24, 253 - 266 (1962)

CAVALLINI, D.; C. de MARCO; S. DUPRÈ und G. ROTILIO : The copper catalyzed oxidation of cysteine to cystine. Arch. Biochem. Biophys. 130, 354 - 361 (1969)

CAVALLINI, D.; R. SCANDURRA und S. DUPRÈ : Cysteamine oxygenase (Horse kidney). In "Methods in enzymology" Vol. XVII B, H. Tabor und C.W. Tabor (eds.) S. 479 - 483 Academic Press, New York 1971

CHAMBERS, L.A. und P.A. TRUDINGER : Cysteine and S-sulfocysteine biosynthesis in bacteria. Arch. Mikrobiol. 77, 165 - 184 (1971)

CHAPEVILLE, F. und P. FROMAGEOT : Formation de sulfite, d'acide cysteique et de taurine à partir de sulfate par l'oeuf embryonné. Biochem. Biophys. Acta 26, 538 - 558 (1957)

CHEN, S.S.; J.H. WALGATE und J. DUERRE : Oxidative deamination of sulfur amino acids by bacterial and snake venom L-amino acid oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 146, 51 - 63 (1971)

CHEUNG, G.P.; I.Y. ROSENBLUM und H.J. SALLACH : Comparative studies of enzymes related to serine metabolism in higher plants. Plant Physiol. 43, 1813 - 1820 (1968)

CHINARD, F.P. : Photometric estimation of proline and ornithine. J. Biol. Chem. 199, 91 - 95 (1952)

CLANDINI, M.T. und E.A. COSSINS : Methionine biosynthesis in isolated Pisum sativum mitochondria. Phytochem. 13, 585 - 591 (1974)

COHEN, Y.; B.B. JÖRGENSEN; E. PADAN und M. SHILO : Sulfide dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium Oscillatoria limnetica. Nature 257, 489 - 492 (1975)

COLLINS, J.M. und K.J. MONTY : The cysteine desulfhydrase of Salmonella typhimurium. Kinetic and catalytic properties. J. Biol. Chem. 248, 5943 - 5949 (1973)

COLLINS, J.M.; A. WALLENSTEIN und K.J. MONTY : Regulatory features of the cysteine desulfhydrase of Salmonella typhimurium. Biochim. Biophys. Acta 313, 156 - 162 (1973)

CONNER, J. und P.J. RUSSEL : Elemental sulfur: A novel inhibitor of adenylate kinase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 113, 348 - 352 (1983)

COOK, P.F. und R.T. WEDDING : A reaction mechanism from steady state kinetic studies for O-acetylserine sulfhydrylase from Salmonella typhimurium LT-2. J. Biol. Chem. 251, 2023 - 2029 (1976)

COOK, P.F. und R.T. WEDDING : Initial kinetic characterization of the multienzyme complex, cysteine synthase. Arch. Biochem. Biophys. 178, 293 - 302 (1977a)

COOK, P.F. und R.T. WEDDING : Overall mechanism and rate equation for O-acetylserine sulfhydrylase. J. Biol. Chem. 252, 3459 (1977b)

COOK, P.F. und R.T. WEDDING : Cysteine synthetase from Salmonella typhimurium LT-2 .
J. Biol. Chem. 253, 7874 - 7879 (1978)

COOPER, A.J.L : Biochemistry of sulfur-containing amino acids. Ann. Rev. Biochem. 52, 187 - 222 (1983)

COOPER, B.P. : Der enzymatische Mechanismus der Sulfataktivierung bei Rhodospirillaceae.
Doktorarbeit, Bonn (1980)

CRAM, W.J. : Characteristics of sulfate transport across plasmalemma and tonoplast of carrot root cells.
Plant Physiol. 72, 204 - 211 (1983a)

CRAM, W.J. : Sulphate accumulation is regulated at the tonoplast. Plant Sci. Lett. 31, 329 - 338 (1983b)

CULLIMORE, J.C. und A.P. SIMS : Glutamine synthetase of Chlamydomonas: Its role in the control of nitrate assimilation. Planta 153, 18 - 24 (1981)

DANEHY, J.P.; V.J. ELIA und C.J. LAVELLE : The alkaline decomposition of organic disulfides. IV. A limitation on the use of Ellman's reagent. 2-2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoic acid.
J. Org. Chem. 36, 1003 - 1005 (1971)

DANN, J.R.; G.L. OLIVER und J.W. GATES JR. : The reaction of cystine and lanthionine with aqueous calcium hydroxide. The identification of 2-methylthiazolidine-2,4-dicarboxylic acid.
J. Am. Chem. Soc. 79, 1644 - 1649 (1957)

DAS, S.R. und K. DAS GUPTA : X-ray diffraction by supercooled liquid sulphur. Nature 143, 332 (1939)

DATKO, A.H. und S.H. MUDD : Responses of sulfur-containing compounds in Lemna paucicostata Hegelm. 6746 to changes in availability of sulfur sources. Plant Physiol. 75, 474 - 479 (1984)

DAVIES, J.R. und S.T. THURAISINGHAM : Quantitative determination of free elemental sulfur in rubber vulcanizates by thin-layer chromatography. J. Chromatogr. 35, 513 - 518 (1968)

DAVIS, R.E. : Displacement reactions at the sulfur atom. I. An interpretation of the decomposition of acidified thiosulfate. J. Am. Chem. Soc. 80, 3565 - 3569 (1958)

DAVIS, R.E. und H.F. NAKSHBENDI : Sulfur in amine solvents. J. Am. Chem. Soc. 84, 2085 - 2090 (1962)

DAVIS, R.E. und D.E. Metzler : Pyridoxal-linked elimination and replacement reactions. In "The enzymes" P.D. Boyer (ed.) III. Eds. Vol. VII, S. 33 - 74 Academic Press, New York und London 1972

DIESSNER, W. : O-Acetylserinsulfhydrylase aus Synechococcus 6301. Staatsexamansarbeit, Munchen (1980)

DIESSNER, W. und A. SCHMIDT : Isoenzymes of cysteine synthase in the cyanobacterium Synechococcus 6301.
Z. Pflanzenphysiol. 102, 57 - 68 (1981)

DIEZEL, W. ; G. KOPPENSCHLÄGER und E. HOFMANN : An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of coomassie brilliant blue. Anal. Biochem. 48, 617 - 620 (1972)

DI STEFANO, A.; R. PAGANI und E. MARINELLO : Spinach threonine dehydratase.
Ital. J. Biochem. 27, 75 - 82 (1978)

DÖBELI, H. und J. NUESCH : Regulatory properties of O-acetyl-L-serine sulfhydrylase of Cephalosporium acremonium : Evidence of an isoenzyme and its importance in Cephalosporin C biosynthesis.
Antimicrob. Agents Chemother. 18, 111 - 117 (1980)

DOI, E.; D. SHIBATA und T. MATOBA : Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay.
Anal. Biochem. 118, 173 - 184 (1981)

DONEY, R.C. und J.F. THOMPSON : The reduction of S-methyl-L-cysteine sulfoxide and methionine sulfoxide in turnip and bean leaves. Biochim. Biophys. Acta 124, 39 - 49 (1966)

DONEY, R.C. und J.F. THOMPSON : The recovery of radioactivity on methionine from labelled S-methyl-L-cysteine in leaves of Phaseolus vulgaris. Phytochem. 10, 1745 - 1750 (1971)

DUNNILL, P.M. und L. FOWDEN : Enzymatic formation of ß-cyanoalanine from cyanide by Escherichia coli extracts. Nature 208, 1206 - 1207 (1965)

ELBANOWSKI, M. : A study of the photophysical and photochemical properties of the S_8 molecule. Photochemical reactions in the S_8 + liquid methanol system with and without sensitizers: Benzene, naphthalene and pyrene II. Phosphorus and sulfur 5, 111 - 116 (1978)

ELBANOWSKI, M. und J. WOJTCZAK : A study of the photophysical and photochemical properties of the S_8 molecule. The quenching of benzene, naphthalene and pyrene fluorescence by S_8 molecules in S_8 + liquid

ELLIS, R.J. und D.D. DAVIES : Glutamic-oxaloacetic transaminase of Cauliflower. Biochem. J. 78, 615 - 623 (1961)

ELLIS, R.J. : Sulphur metabolism: the usefulness of N-ethylmaleimide. Nature 211, 1266 - 1268 (1966)

ELLIS, R.J. : Sulphate activation in higher plants. Planta 88, 34 - 42 (1969)

ELLMAN, G.L. : Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 - 77 (1959)

ELTHON, T.E. und C.R. STEWART : Effects of the proline analog L-thiazolidine-4-carboxylic acid on proline metabolism. Plant Physiol. 74, 213 - 218 (1984)

ERISMANN, H.H. und A. FINGER : Lemnaceen in kontinuierlicher Kultur. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 78, 5-15 (1968)

EVSTIGNEEVA, Z.G.; E.A. GROMYKO und V.L. KRETOVICH : The regulation of Chlorella glutamine synthetase. Biokhimiya 39, 153 - 157 (1974) (engl. Ausg. 126 - 130)

FANKHAUSER, H.; C. BRUNOLD und K.H. ERISMANN : Subcellular localization of O-acetylserine sulfhydrylase in spinach leaves. Experientia 32, 1494 - 1497 (1976)

FANKHAUSER, H. und C. BRUNOLD : Localization of O-acetyl-L-serine sulfhydrylase in Spinacia oleracea L. Plant Sci. Lett. 14, 185 - 192 (1979)

FANSHIER, D.W. und E. KUN : Properties of ß-mercaptopyruvate transsulfurase chromatographically resolved in the presence of ß-mercaptoethanol. Biochim. Biophys. Acta 58, 266 - 278 (1962)

FAZEKAS de St. GROTH, S.; R.G. WEBSTER und A. DATYNER : Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. Biochim. Biophys. Acta 71, 377 - 391 (1963)

FEDERIUK, C.S. und J.A. SHAFER : Inactivation of D-serine dehydratase by alkylamines via a transamination of enzyme-linked cofactor. J. Biol. Chem. 256, 7416 - 7423 (1981)

FELDMAN, S.L.; J.S.V. HUNTER; A. ZGIRSKI; M.V.CHIDAMBARAM und E. FRIEDEN : Comparison of the catalytic oxidation of cysteine and o-dianisidin by cupric ion and ceruloplasmin. J. Inorg. Biochem. 17, 51 - 60 (1982)

FERGUSON, A.R. und A.P. SIMS : Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-spezific glutamate dehydrogenase: Its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. J. Gen. Microbiol. 69, 423 - 427 (1971)

FERRARI, G. und F. RENOSTO : Regulation of sulfate uptake by excised barley roots in the presence of selenate. Plant Physiol. 49, 114 - 116 (1972)

FILNER, P. und H. RENNENBERG : Possible functions of H_2S emission by plants. Plant research 81, MSU-SOE Plant Research Lab. Michigan S. 59 - 60 (1981)

FISCHER, U. und H.G. TRÜPER : Cytochrome c-550 of Thiocapsa roseopersicina: Properties and reduction by sulfide. FEMS Letters 1, 87 - 90 (1977)

FISCHER, U. : Die Rolle von Cytochromen im Schwefelstoffwechsel phototroper Schwefelbakterien. Doktorarbeit, Bonn (1977)

FLAVIN, M. : Microbial transsulfuration: The mechanism of an enzymatic disulfide elimination reaction. J. Biol. Chem. 237, 768 - 777 (1962)

FLAVIN, M. und C. SLAUGHTER : Synthesis of succinic ester of homoserine, a new intermediate in the bacterial biosynthesis of methionine. Biochem. 4, 1370 - 1377 (1965)

FLETCHER, J.C. und A. ROBSON : The occurence of bis-(2-amino-2-carboxyethyl)-trisulfide in hydrolysates of wool and other proteins. Biochem. J. 87, 553 - 559 (1963)

FLOSS, H.G.; L. HADWIGER und E.E. CONN : Enzymatic formation of ß-cyanoalanine from cyanide. Nature 208, 1207 - 1208 (1965)

FLOSS, H.G.; E. SCHLEICHER und R. POTTS : Stereochemistry of the formation of cysteine by O-acetyserine sulfhydrase. J. Biol. Chem. 251, 5478 - 5482 (1976)

FOGO, J.K. und M. POPOWSKI : Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide. Anal. Chem. 21, 732 - 734 (1949)

FOREST, J.C. und F. WIGHTMAN : Aminoacid metabolism in plants. Transamination reactions of free protein amino acids in cell-free extracts of cotyledons and growing tissues of bushbean seedlings (Phaseolus vulgaris L.) Can. J. Biochem. 50, 538 - 542 (1972)

FOSS, O : The prevalence of unbranched sulphur chains in polysulfides and polythionic compounds. Acta Chemica Scand. 4, 404 - 415 (1950)

FRIEDMAN, M. und C.W. SIGEL : A kinetic study of the ninhydrin reaction. Biochemistry 5, 478 - 484 (1966)

FRIEDMAN, M.; A.T. NOMA und J.R. WAGNER : Ion-exchange chromatography on a single-column amino acid analyzer Anal. Biochem. 98, 293 - 304 (1979)

FRIMPTER, G.W.; S. OHMORI und S. MIZUHARA : Ion-exchange chromatography of sulfur amino acids and the separation of diastereomers. J. Chromatogr. 10, 439 - 442 (1963)

GAITONDE, M.K. : A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occuring amino acids. Biochem. J. 104, 627 - 633 (1967)

GAMON, B. : Untersuchung zur Thiosulfat-Spaltung durch Rhodanesen und Thiosulfat Reduktasen aus der Grünalge Chlorella fusca . Diplomarbeit, München (1983)

GARLICK,S.; A. OREN und E. PADAN : Occurence of facultative anoxygenic photosynthesis among filamentous and unicellular Cyanobacteria J. Bacteriol. 129, 623 - 629 (1977)

GAWRON, O. und J. FERNANDO : Kinetics of the cyanide-cystine reaction. J. Am Chem. Soc. 83, 2906 - 2908 (1961)

GERWICK, B.C. und C.C. BLACK JR. : Sulfur assimilation in plants. Intercellular compartmentation of adenosine-5'-triphosphate sulfurylase in crabgrass leaves. Plant Physiol. 64, 590 - 593 (1979)

GIOVANELLI, J. und S.H, MUDD : Sulfuration of O-acetylhomoserine by two enzyme fractions from spinach. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 275 - 280 (1968)

GIOVANELLI, J.; S.H. MUDD und A.H. DATKO : Homocysteine biosynthesis in green plants. Physiological importance of the transsulfuration pathway in Chlorella sorokiniana growing under steady state conditions with limiting sulfate. J. Biol. Chem. 253, 5665 - 5677 (1978)

GIOVANELLI, J.; S.H. MUDD und A. H. DATKO : Sulfur amino acids in plants. In "The biochemistry of plants" Vol. 5 Amino acids and derivatives. B.F. Miflin (ed.) S. 453 - 503 Academic Press, London 1980

GLASER, C.B.; H. MAEDA und J. MEIENHOFER : Chromatographic detection of thiols, disulfides, and thioesters with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). J. Chrom. 50, 151 - 154 (1970)

GMELIN, R.; R. SUSILO und G.R. FENWICK : Cyclic polysulfides from Parkia speciosa. Phytochem. 20, 2521 - 2523 (1981)

GOLDBECK, J.H. und A. SAN PIETRO : Determination of acid-labile sulfide in subchloroplast particles containing Triton X-100. Anal. Biochem. 73, 539 - 542 (1976)

GORLENKO, W.M. und T.I. ZHILINA: A study on the fine structure of green bacteria, strain SK-413. Microbiologia 37, 1052 - 1056 (1968)

GRAMBORG, O.L.; R.A. MILLER und K. OJIMA : Nutrient requirements of suspension cultures of soy bean root cells. Exp. Res. 50, 151 - 158 (1968)

GRANROTH, B.: Biosynthesis and decomposition of cysteine derivatives in onion and other Allium species. Ann. Acad. Sci. Fennicae A II 154, 9 - 71 (1970)

GRANROTH, B. und A. SARNESTO : Synthesis of S-substituted cysteine derivates by the cysteine synthase (O-acetylserine sulfhydrylase) of onion (Allium cepa) and Escherichia coli. Acta Chem. Scand. B 28, 814 - 815 (1974)

GRASSETTI, D.R. und J.F. MURRAY JR. : Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. Arch. Biochem. Biophys. 119, 41 - 49 (1967)

GREENBLATT, C.L. und J.A. SCHIFF : A pheophytin like pigment in dark adapted Euglena gracilis . J. Protozool. 6, 23 - 28 (1959)

GREENSTEIN, J.P. und M. WINITZ : Chemistry of the amino acids. Vol. 3 S. 1907 J. Wiley & sons, Inc. New York, London 1961

GRIFFITH, O.W.; A. LARSSON und A. MEISTER : Inhibition of γ-glutamylcysteine synthetase by cystamine; an approach to a therapy of 5-Oxoprolinuria (pyroglutamic aciduria). Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 919 - 925 (1977)

GROB, C.A. und C. WAGNER : Die konkurrierende 1,2- und 1,3-Acylwanderung. Zur Kenntnis des 2-Oxy-3,4-diaminopentans. II. Teil. Helv. Chim. Acta 38, 1699 - 1707 (1955)

GUARNEROS, G. und M.V. ORTEGA : Cysteine desulfhydrase activities of Salmonella typhimurium and Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 198, 132 - 142 (1970)

GUNDLACH, G.; G. HOPPE-SEYLER und H.J. BACKES : Quantitative Bestimmung von Cystin im Harn von Cystinurikern. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 578 - 579 (1974)

HAGEAGE, G.J.; E.D. EANES und R.L. GHERNA : X-ray diffraction studies of the sulfur globes accumulated by Chromatium species. J. Bacteriol. 101, 464 - 469 (1970)

HALL, D.I. und I.K. SMITH : Partial purification and characterization of cystine lyase from cabbage (Brassica oleracea var. capitata). Plant Physiol. 72, 654 - 658 (1983)

HAMPP, R. und I. ZIEGLER : Sulfate and sulfite translocation via the phosphate translocator of the inner envelope membrane of chloroplasts. Planta 137, 309 - 312 (1977)

HANAKI, A. und H. KAMIDE : Autoxidation of cysteine catalyzed by copper in glycylglycine buffer. Chem. Pharm. Bull. 23, 1671 - 1676 (1975)

HANSEN, T.A. und H. VAN GEMERDEN : Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. Arch. Mikrobiol. 86, 49 - 56 (1972)

HANSEN, T.A. und H. VELDKAMP : Rhodopseudomonas sulfidophila nov. spec., a new species of the purple nonsulfur bacteria. Arch. Mikrobiol. 92, 45 - 58 (1973)

HANSEN, T.A.; A.B.J. SEPERS und H. VAN GEMERDEN : A new purple bacterium that oxidizes sulfide to extracellular sulfur and sulfate. Plant and Soil 43, 17 - 27 (1975)

HARDING, V.J. und R.M. MacLEAN : The ninhydrin reaction with amines and amides. J. Biol. Chem. 25, 337 - 350 (1916)

HARRINGTON, H.M. und I.K. SMITH : Cysteine transport into cultered tobacco cells. Plant Physiol. 60, 807 - 811 (1977)

HARRINGTON, H.M. und I.K. SMITH : Cysteine metabolism in cultured tobacco cells. Plant Physiol. 65, 151 - 155 (1980)

HARRIS, C.L. : Cysteine and growth inhibition of Escherichia coli. Threonine deaminase as the target enzyme. J. Bacteriol. 145, 1031 - 1035 (1981)

HART, J.W. und P. FILNER : Regulation of sulfate uptake by amino acids in cultured tobacco cells. Plant Physiol. 44, 1253 - 1259 (1969)

HASE, T.; M. KOREEDA und K. HASEGAWA : A growth inhibitor, 2-thioxothiazolidine-4-carboxylic acid from Sakurajima radish seedlings. Phytochem. 22, 1275 - 1276 (1983)

HASHWA, F. und N. PFENNIG : The reductive enzymatic cleavage of thiosulfate. Arch. Mikrobiol. 81, 36 - 44 (1972)

HATCH, M.D. und J.F. TURNER : A protein disulphide reductase from pea seeds. Biochem. J. 76, 556 - 562 (1960)

HELDT, H.W.; K. WERDAN; M. MILOVANCEV und G. GELLER : Alkalization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. Biochem. Biophys. Acta 314, 224 - 241 (1973)

HENDLEY, D.D. : Endogenous fermentation in Thiorhodaceae. J. Bacteriol. 70, 625 - 634 (1975)

HENDRICKSON, H.R. und E.E. CONN : Cyanide metabolism in higher plants. Purification and properties of the ß-cyanoalanine synthase of blue lupine. J. Biol. Chem. 244, 2632 - 2640 (1969)

HENSEL, G. und H.G. TRUPER : Cysteine and S-sulfocysteine biosynthesis in phototrophic bacteria. Arch. Microbiol. 109, 101 - 103 (1976)

HENSEL, G. : O-Acetylserin-sulfhydrylase und S-Sulfocysteinsynthase aus Chromatium vinosum und Rhodospirillum tenue : Molekulare, kinetische und regulatorische Eigenschaften. Doktorarbeit, Bonn (1979)

HENSEL, G. und H.G. TRUPER : O-acetylserine sulfhydrylase and S-sulfocysteine synthase activities of Chromatium vinosum. Arch. Microbiol. 130, 228 - 233 (1981)

HENSEL, G. und H.G. TRUPER : O-acetylserine sulfhydrylase and S-sulfocysteine synthase activities of Rhodospirillum tenue. Arch. Microbiol. 134, 227 - 232 (1983)

HINZE, G. : Über Schwefeltröpfchen im Inneren von Oscillarien. Ber. Deut. Bot. Ges. 103, 394 - 398 (1903)

HIRS, C.H. : The oxidation of ribonuclease with performic acid. J. Biol. Chem. 219, 611 - 621 (1956)

HODSON, R.C.; J.A. SCHIFF und A.J. SCARSELLA : Studies of sulfate utilization by algae. 7. In vivo metabolism of thiosulfate by Chlorella. Plant Physiol. 43, 570 - 577 (1968)

HODSON, R.C.; J.A. SCHIFF und J.P. MATHER : Studies of sulfate utilization by algae. 10. Nutritional and enzymatic characterization of Chlorella mutants impaired for sulfate utilization. Plant Physiol. 47, 306 - 311 (1971)

HOLMGREEN, A. : Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. J. Biol. Chem. 254, 9113 - 9119 (1979)

HULANICKA, M.D.; S.G. HALLQUIST; N.M. KREDICH und T. MOJICA-A : Regulation of O-acetylserine sulfhydrylase B by L-cysteine in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 140, 141 - 146 (1979)

HYLIN, J.W. und J.L. WOOD : Enzymatic formation of polysulfides from mercaptopyruvate. J. Biol. Chem. 234, 2141 - 2144 (1959)

IKAWA, M.; V.M. THOMAS JR.; L.B. BUCKLEY und J.J. UEBEL : Sulfur and the toxicity of the red alga Ceramium rubrum to Bacillus subtilis. J. Phycol. 9, 302 - 304 (1973)

IMHOFF, J.F.; J. THEN; F. HASHWA und H.G. TRÜPER : Sulfate assimilation in Rhodopseudomonas globiformis. Arch. Microbiol. 130, 234 - 237 (1981)

IMHOFF, J.F.; M. KRAMER und H.G. TRÜPER : Sulfate assimilation in Rhodopseudomonas sulfidophila. Arch. Microbiol. 136, 96 - 101 (1983)

IZAK, R.R.; D.B. STIERLE und J.J. SIMS : Sulfur and N-methylformamide from the marine red alga Erythrophyllum delesserioides. Phytochem. 21, 229 (1982)

JACOBSEN, J.G. und L.K. SMITH : Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. Physiological Reviews 48, 424 - 511 (1968)

JAGURA-BURDZY, G. und N.M. KREDICH : Cloning and physical mapping of the cys B region of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 155, 578 - 585 (1983)

JARABAK, R. und J. WESTLEY : 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase : Rapid equilibrium-ordered mechanism with cyanide as the acceptor substrate. Biochemistry 19, 900 - 904 (1980)

JEANJEAN, R. und E. BRODA : Dependence of sulphate uptake by Anacystis nidulans on energy, on osmotic shock and on sulphate starvation. Arch. Microbiol. 114, 19 - 23 (1977)

JENNI, B.E.; C. BRUNOLD; J.-P. ZRYD und P. LAVACHY : Properties and regulation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase from suspension cultures of Nicotiana sylvestris. Planta 150, 140 - 143 (1980)

JENSEN, P. und T. KÖNIG : Development of regulation mechanisms for SO_4^{2-} influx in spring wheat roots. Physiol. Plant. 55, 459 - 464 (1982)

JOCELYN, P.C. : The effect of glutathione on protein sulphydryl groups in rat-liver homogenates. Biochem. J. 85, 480 - 485 (1962)

JOHNSON, J.L.; B.E. HAINLINE und K.V. RAJAGOPADAN : Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase and nitrat reductase. J. Biol. Chem. 255, 1783 - 1786 (1980)

JONES, R.F.; H.C. SPEER und W. KURY : Studies in the growth of the red alga Porphyridium cruentum. Physiol. Plant. 16, 636 - 643 (1963)

JONES-MORETIMER, M.C.; J.F. WHELDRAKE und C.A. PASTERNAK : The control of sulphate reduction in Escherichia coli by O-acetyl-L-serine. Biochem. J. 107, 51 - 53 (1968)

JOOSTE, J. van der W. und D.E. MORELAND : Preliminary characterization of some plant carboxylic ester hydrolases. Phytochem. 2, 263 - 271 (1963)

KACAK, B. und Z.J. VEJDELEK : Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen. Verlag Chemie, Weinheim Band 1 und 2 1974 1. Ergänzungsband 1977 2. Ergänzungsband 1983

KAJI, A. und W.D. McELROY : Mechanism of hydrogen sulfide formation from thiosulfate. J. Bact. 77, 630 - 637 (1959)

KALLEN, R.G. : Equilibria for the reaction of cysteine and derivatives with formaldehyde and protons. J. Am. Chem. Soc. 93, 6227 - 6235 (1971a)

KALLEN, R.G. : The mechanism of reactions involving schiff base intermediates. Thiazolidine formation from L-cysteine and formaldehyde. J. Am. Chem. Soc. 93, 6236 - 6248 (1971b)

KARPEISKII, M.Y. und Y.N. BREUSOV : The structure of the enzyme-inhibitor complex of aspartate transaminase with L-cycloserine. Biokhimiya 30, 153 - 160 (1965)(engl. Ausg. 131 - 137)

KASHIWAMATA, S. und D.M. GREENBERG : Studies on cystathionine synthase of rat liver. Properties of the highly purified enzyme. Biochim. Biophys. Acta 212, 488 - 500 (1970)

KATUNUMA, N.; M. OKADA; T. KATSUNUMA; A. FUIJNO und T. MATSUZAWA : In "Pyridoxal catalysis: Enzymes and model systems" E.E. Snell; A.E. Braunstein; E.S. Severin und Y.M. Torchinsky (eds.) S. 255 - 268 Interscience, New York 1968

KERNER, K. : Physiologische Aspekte des Schwefelstoffwechsels und der Äthylenbildung bei der Keimung von Brassica napus. Staatsexamensarbeit, München 1983

KESSLER, D.L. und K.V. RAJAGOPADAN : Purification and properties of sulfite oxidase from chicken liver. Presence of molybdenum in sulfite oxidase from diverse sources. J. Biol. Chem. 247, 6566 - 6573 (1972)

KLAPHECK, S.; W. GROSSE und L. BERGMANN : Effects of sulfur deficiency on protein synthesis and amino acid accumulation in cell suspension cultures of Nicotiana tabacum. Z. Pflanzenphysiol. 108, 235 - 245 (1982)

KOBASHI, K. : Catalytic oxidation of sulfhydryl groups by o-phenanthroline copper complex. Biochem. Biophys. Acta 158, 239 - 245 (1968)

KOBAYASHI K. : Studies on the new metabolites of cystine : I. Orientation studies on the in vitro formation of S-(carboxymethylthio)cysteine and S-(2-hydroxy-2-carboxyethylthio)cysteine from cystine and its related compounds. Physiol. Chem. Physics 2, 455 - 466 (1970)

KOH, T. und I. IWASAKI : A new spectrophotometric method for the determination of micro amounts of thiocyanate by solvent extraction. Bull. Chem. Soc. Jap. 40, 569 - 575 (1967)

KONDO, Y.; T. KUMEYAMA und N. TAMIKE : The decomposition of ß-mercaptopyruvate acid by Escherichia coli and its extracts. J. Biol. Chem. 49, 749 - 760 (1956)

KRÄMER, E.: Nachweis und Charakterisierung von membrangebundenen Cysteinoxidasen aus der Grünalge Chlorella fusca und der Blaualge Synechococcus 6301. Diplomarbeit, München 1983

KRÄMER, E. und A. SCHMIDT : Oxidation of cysteine to cystine by membrane fractions of Chlorella fusca Planta 160, 235 - 241 (1984)

KRAMER, D.N.; N. KLEIN und R.A. BASELICE : Quantitative determination of glyoxylic acid. Anal. Chem. 31, 250 - 252 (1959)

KRAN, G.; F.W. SCHLOTE und H.G. SCHLEGEL : Cytologische Untersuchungen an Chromatium okenii Perty. Naturwissenschaften 50, 728 - 730 (1963)

KRAUSS, F. und A. SCHMIDT : Separation of sulphur-containing substances, amino acids and nucleotides during gel filtration on trisacryl GF05 by specific gel interaction. J. Chromatogr. 264, 111 - 118 (1983)

KREDICH, N.M. und G.M. TOMKINS : The enzymatic synthesis of L-cysteine in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem. 241, 4955 - 4965 (1966)

KREDICH, N.M. : Regulation of L-cysteine biosynthesis in Salmonella typhimurium. I. Effects of growth on varying sources and O-acetyl-L-serine on gene expression. J. Biol. Chem. 246, 3474 - 3484 (1971)

KREDICH, N.M. und M.A. BECKER : Cysteine biosynthesis: Transacetylase and O-acetylserine sulfhydrylase (Salmonella typhimurium). In "Methods in Enzymology" S.P. Colowick und N.O. Kaplan (eds.) Vol 17 B, Metabolism of amino acids and amines. H. Tabor und C.W. Tabor (eds.) S. 459 - 470, Academic Press, New York und London 1971

KREDICH, N.M.; L.J. FOOTE und B.S. KEENAN : The stoichiometry and kinetics of the inducible cysteine desulfhydrase from Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem. 248, 6187 - 6196 (1973)

KREDICH, N.M.; L.J. FOOTE und M.D. HULANICKA : Studies on the mechanism of inhibition of Salmonella typhimurium by 1,2,4-triazol. J. Biol. Chem. 250, 7324 - 7331 (1975)

KREUZBERG, K. : Enzyme der Formiatgärung in Grünalgen: Nachweis und Lokalisation. Tagung der deutschen Botanischen Gesellschaft Posternr. 014 Freiburg (1982)

KÜHLHORN, F. und A. SCHMIDT : Formation of cyclic adenosine-3'-5'-monophosphate (cAMP) from adenosine-5'-phosphosulfate (APS) in Chlamydomonas reinhardtii CW 15? Z. Naturforsch. 35c, 423 - 430 (1980)

KUHN, R. und I. HAMMER : Umsetzungsprodukte von Chinonen und anderen Carbonylverbindungen mit Cystein. Ber. 84, 91 - 95 (1951)

KUMAGAI, H.; Y.-J. CHOI; S. SEJIMA und H. YAMADA : Synthesis of S-alkyl-L-cysteine from pyruvate, ammonia and alkyl-mercaptan by cysteine desulfhydrase of Aerobacter aerogenes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 789 - 795 (1974)

KUMAGAI, H.; Y.-J. CHOI; S. SEJIMA und H. YAMADA : Formation of cysteine desulfhydrase by bacteria. Agric. Biol Chem. 39, 387 - 392 (1975a)

KUMAGAI, H.; S. SEJIMA; Y.-J.CHOI; H. TANAKA und H. YAMADA : Crystallization and properties of cysteine desulfhydrase from Aerobacter aerogenes. FEBS Letters 52, 304 - 307 (1975b)

KUN, E. und M. GARCIA-HERNANDEZ : Identification and quantitative determination of keto acids by paper chromatography. Biochim. Biophys. Acta 23, 181 - 191 (1957)

LAK, N.D.; E.V. GORYACHENKOVA und A.E. BRAUNSTEIN : The substrate specifity of serine sulfhydrase from hen liver and its relation to inhibitors. Biokhimiya 35, 270 - 277 (1970) (engl. Ausg. 220 - 225)

LAMOTHE, P.J. und P.G. McCORMICK : Role of hydrindantin in the determination of amino acids using ninhydrin. Anal. Chem. 45, 1906 - 1911 (1973)

LA RIVIÈRE, J.W.M. : Cultivation and properties of Thiovulum majus Hinze. In "Marine Microbiology" C.H. Oppenheimer und C.C. Thomas (eds.) S. 61 - 72 , Publisher , Springfield 1963

LARSSON, C. und F. ALBERTSON : Enzymes related to serine synthesis in spinach chloroplasts. Physiol. Plant. 45, 7 - 10 (1979)

LIBENSON, L.; F.P. HADLEY; A.P. McILROY; V.M. WETZEL und R.R. MELLON : Antibacterial effect of elemental sulfur. J. Infectious Diseases 93, 28 - 35 (1953)

LIDDELL, H.F. und B. SAVILLE : Colorimetric determination of cysteine.Analyst 84, 188 - 190 (1953)

LINKE, W.F. : Solubilities of inorganic and metal organic compounds. Vol. II. S. 1398 , Washington DC Am. Chem. Soc. 1965

LOMBARDI, F.J. und H.R. KABACK : Mechanism of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. VIII. The transport of amino acids by membranes prepared from Escherichia coli J. Biol. Chem. 247, 7844 - 7857 (1972)

MacFADYEN, D.A. : On the mechanism of the reaction of ninhydrin with α-amino acids. I. Absorption spectra of ninhydrin and certain derivatives. J. Biol. Chem. 186, 1 - 12 (1950)

MADIGAN, M.T. und T.D. BROCK : Photosynthetic sulfide oxidation by Chloroflexus aurantiacus, a filamentous, photosynthetic, gliding bacterium. J. Bacteriol. 122, 782 - 784 (1975)

MADISON, J.T. und J.F. THOMPSON : Threonine synthetase from higher plants: Stimulation by S-adenosyl-methionine and inhibition by cysteine. Biochem. Biophys. Res. Comm. 71, 684 - 690 (1976)

MAGGIONI, A. und F. RENOSTO : Cysteine and methionine regulation of sulfate uptake in potato tuber discs (Solanum tuberosum). Physiol. Plant. 39, 143 - 147 (1977)

MAHLER, H.R. und E.H. CORDES : Biological chemistry. S. 196, Harper und Row, New York, 1966

MALLOY, M.H.; D.K. RASSIN und G.E. GAULL: A method for measurement of free and bound plasma cyst(e)ine. Anal. Biochem. 113, 407 - 415 (1981)

MAN, M. und R.G. BRYAN : Reactions of thiosulfate and sulfite ions with DTNB : Interference in sulfhydryl group analysis. Anal. Biochem. 57, 429 - 431 (1974)

MASADA, M.; K. FUKUSHIMA und G. TANURA : Cysteine synthase from rape leaves. J. Biochem. 77, 1107 - 1115 (1975)

MATCHAM, G.W.J.; K.S. DODSON und J.W. FITZGERALD : Purification, properties and cellular localization of the stereospecific CS2 secondary alkylsulphohydrolase of Comamonas terrigena. Biochem. J. 167, 723 - 729 (1977)

MATSUURA, T. und D. SZAFARZ : A micro-method for the estimation of cystine in protein hydrolysates. Experientia 21, 737 - 738 (1965)

MAW, G.A. und C.M. COYNE : The metabolism of S-methylcysteine in yeasts. Arch. Biochem. Biophys. 127, 241- 251 (1968)

MAYER, A.M. : Subcellular location of sulphite reductase in plant tissues. Plant Physiol. 42, 324 - 326 (1967)

MAZELIS, M. : Demonstration and characterization of cysteine sulfoxides lyase in the cruciferae. Phytochem. 2, 15 - 22 (1963)

MAZELIS, M.; N. BELMER und R.K. CREVELING : Cleavage of L-Cystine by soluble enzyme preparations from Brassica species. Arch Biochem. Biophys. 120, 371 - 378 (1967)

MAZELIS, M. und L. FOWDEN : O-acetyl-L-serine lyase : A new ß-eliminase in extracts from higher plants. Phytochem. 11, 619 - 622 (1972)

MAZELIS, M.; K. SCOTT und D. GALLIE : Non-identity of cystine lyase with ß-cystathionase in turnip roots. Phytochem. 21, 991 - 995 (1982)

McCALDIN; D.J. : The chemistry of ninhydrin. Chem. Rev. 60, 39 - 51 (1960)

MEAD, R.J. und W. SEGAL : Formation of ß-cyanoalanine and pyruvate by Acacia georginae. Phytochem. 12, 1977 - 1981 (1973)

MEISTER, A.; P.E. FRASER und S.V. TICE : Enzymatic desulfuration of ß-mercaptopyruvate to pyruvate. J. Biol. Chem. 206, 561 - 575 (1954)

MENON, V.K.N. und A.K. VARMA : Sulfate uptake in the cyanobacterium Spirulina platensis. FEMS Microbiol. Lett. 13, 141 - 146 (1982)

MEYER, B. : Solid allotropes of sulfur. Chem. Rev. 64, 429 - 451 (1964)

MEYER, B.: Sulfur, energy and enviroment. S. 48, Elsevier, Amsterdam 1977

MEYER, H. The ninhydrin reaction and its analytical applications. Biochem. J. 67, 333 - 340 (1957)

MICHAELIS, L.; S. GRANICK und M.P. SCHUBERT : An other type of free radical in the group of thiazines and some other related heterocyclic rings. J. Am. Chem. Soc. 63, 351 - 355 (1941)

MILLER, J.M. und E.E. CONN : Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. Plant Physiol. 65, 1199 - 1202 (1980)

MIURA, G.A. und S.E. MILLIS : The conversion of D-tryptophan to L-tryptophan in cell culture of tobacco. Plant Physiol. 47, 483 - 487 (1971)

MOORE, R.E.: Bis-(3-oxoundecyl)polysulfides in Dictyopteris. Chem. Communications 13, 1168 - 1169 (1971)

MOORE, S. und W.H. STEIN : Photometric ninhydrin method for the use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. 176, 367- 388 (1948)

MORINAGA, Y.; Y. TANI und H. YAMADA : Biosynthesis of homocysteine in a facultative methylotroph, Pseudomonas FM518 . Agric. Biol. Chem. 47, 2855 - 2860 (1983)

MUDD, J.R. und R. deZACKS : Studies of sulfolipid biosynthesis. Plant Research 79, MSU-SOE Plant Reseaerch. Lab. Michigan , S. 38 - 39 (1979)

MUNCIE, J.G.; F.M. ROTHWELL und W.G. KESSEL : Elemental sulfur accumulation in Pisolithus. Mycopathologia 55, 95 - 96 (1975)

NAKAMURA, H. : Über das Auftreten des Schwefelkugelchens im Zellinneren von einigen niedrigen Algen. Bot. Mag. 51, 529 - 533 (1937)

NAKAMURA, H. und Z. TAMURA : Chromatographic detection of bunte salts and disulphides. J. Chromatogr. 104, 389 - 398 (1975)

NAKAMURA, T. und R. SATO : Synthesis from sulphate and accumulation of S-sulphocysteine by a mutant strain of Aspergillus nidulans. Biochem. J. 86, 328 - 335 (1963)

NAKAMURA, T.; Y. KON; H. IWAHASHI und Y. EGUCHI : Evidence that thiosulfate assimilation by Salmonella typhimurium is catalyzed by cysteine synthase B. J. Bacteriol. 156, 656 - 662 (1983)

NASHEF, A.W.; D.T. OSUGA und R.E. FEENEY : Determination of hydrogen sulfide with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), N-ethylmaleimide, and parachloromercuribenzoate. Anal. Biochem. 79, 394 - 405 (1977)

NEUTZLING, O. und H.G. TRÜPER : Assimilatory sulfur metabolism in Rhodopseudomonas sulfoviridis. Arch. Microbiol. 133, 145 - 148 (1982)

NEUZIL, E.; J. JOSSELIN; H.JENSEN; J. HERVIEU und R. JENSEN : Un nouvel aspect de la réactivité des thiocyanates alcalins.: Leur réaction avec la ninhydrine. Bull. Soc. Chim. France 6, 2337 - 2342 (1971)

NG, B.H. und J.W. ANDERSON : Chloroplast cysteine synthase of Trifolium repens and Pisum sativum . Phytochem. 17, 879 - 885 (1978a)

NG, B.H. und J.W. ANDERSON : Synthesis of selenocysteine by cysteine synthases from selenium accumulator and non-accumulator plants. Phytochem. 17, 2069 - 2074 (1978b)

NG, B.H. und J.W. ANDERSON : Light-dependent incorporation of selenite and sulphite into selenocysteine and cysteine by isolated pea chloroplasts. Phytochem. 18, 573 - 580 (1979)

NGO, T.T. und P.D. SHARGOOL : The use of a sulfide ion selective electrode to study O-acetylserine sulfhydrylase from germinating rape seed. Anal. Biochem. 54, 247 - 261 (1973)

NGO, T.T. und P.D. SHARGOOL : The enzymatic synthesis of L-cysteine in higher plant tissues. Can. J. Biochem. 52, 435 - 440 (1974)

NICOLSEN, G.L. und G.L. SCHMIDT : Structure of the Chromatium sulfur particle and its protein membrane. J. Bacteriol. 105, 1142 - 1148 (1971)

NIGAM, S.N. und W.B. McCONNELL : Biosynthesis of ß-cyanoalanine in Vicia sativa. Can. J. Biochem. 49, 799 - 801 (1971)

OHKISHI, H.; D. NISHIKAWA; H. KUMAGAI und H. YAMADA : Distribution of cysteine desulfhydrase in microorganism. Agric. Biol. Chem. 45, 253 - 257 (1981a)

OHKISHI, H.; D. NISHIKAWA; H. KUMAGAI und H. YAMADA : Synthesis of L-cysteine and its analogues by intact cells containing cysteine desulfhydrase. Agric. Biol. Chem. 45, 259 - 263 (1981b)

OREN, A. und M. SHILO : Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium Oscillatoria limnetica: Sulfur respiration and lactate fermentation. Arch. Microbiol. 122, 77 - 84 (1979)

PACHMAYR, F. : Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen im Mineralwasser. Doktorarbeit, München (1960)

PASSERA, C. und R. GHISI : ATP-sulphurylase and O-acetylserine sulphydrylase in isolated mesophyll protoplasts and bundle sheat strands of S-deprived maize leaves. J. Exp. Bot. 33, 432 - 438 (1982)

PASTERNAK, C.A.; R.J. ELLIS; M.C. JONES-MORETIMER und C.E. CRICHTON : The control of sulphate reduction in bacteria. Biochem. J. 96, 270 - 275 (1965)

PETUSHKOVA, Y.P. und R.N. IVANOVSKII : Enzymes participating in thiosulfate metabolism in Thiocapsa roseopersecina during its groups under various conditions. Microbiologiya 45, 960 - 965 (1976) (engl. Ausg. 822 - 827)

PEZET, R. und V. PONT : Elemental sulfur responsible for self-inhibition of spores of Phomopsis viticola. Experientia 31, 439 - 440 (1975)

PEZET, R. und V. PONT : Elemental sulfur: Accumulation in different species of fungi. Science 196, 428 - 429 (1977)

PIENIAZEK, N.J.; P.P. STEPIEN und A. PASZEWSKI : An Aspergillus nidulans mutant lacking cystathionine ß-synthase: Identity of L-serine sulfhydrylase with cystathionine ß-synthase and its distinctness from O-acetyl-L-serine sulfhydrylase. Biochim. Biophys. Acta 297, 37 - 47 (1973)

PINKUS, A.G.; J.S. KIM; J.L. McATEE JR. und C.B. CONCILIO : New lines in the X-ray diffraction pattern of orthorhombic sulfur. "Amorphous" (µ)-sulfur. J. Am. Chem. Soc. 79, 4566 - 4567 (1957)

PLATT, S.G. und G.E. ANTHON : Ammonia accumulation and inhibition of photosynthesis in methionine sulfoximine treated spinach. Plant Physiol. 67, 509 - 513 (1981)

POHL, P.; H. GLASL und H. WAGNER : Zur Analytik pflanzlicher Glyco- und Phospholipide und ihrer Fettsäuren. 1. Eine neue DC-Methode zur Trennung pflanzlicher Lipoide und quantitativen Bestimmung deren Fettsäuren-zusammensetzung. J. Chromatogr. 49, 488 - 492 (1970)

PROTA, G. und E. PONSIGLIONE : On the reaction of ninhydrin with cysteine and its analogues : A revision. Tetrahedron 29, 4271 - 4274 (1973)

PRYOR, W.A. : Mechanism of sulfur reactions. Mc Graw Hill, New York, (1962)

PUCHKOVA, N.N.; V.M. GORLENKO und T.A. PIVOVAROVA : A comparative ultrastructural study of vibrioid green sulfur bacteria. Mikrobiologiya 44, 89 - 94 (1975) (engl. Ausg. 108 - 114)

PURDIE, J.W.; J.P. FARANT und R.A. GRAVELLE : Sulphur-containing amino acids : Chromatography on cation and anion exchange resins with an automatic analyzer. J. Chromatogr. 23, 242 - 247 (1966)

RAO, G.S. und G. GORIN : Reaction of cystine with sodium sulfide in sodium hydroxide solution. J. Org. Chem. 24, 749 - 753 (1959)

RATNER, S. und H.T. CLARKE : The action of formaldehyde upon cysteine. J. Am. Chem. Soc. 59, 200 - 206 (1937)

REMSEN, C.C. und H.G. TRÜPER : The fine structure of Chromatium buderi. Arch. Mikrobiol. 90, 269 - 280 (1973)

RENNENBERG, H. und R. UTHEMANN : Effects of L-methionine-S-sulfoximine on groth and glutathione synthesis in tobacco suspension cultures. Z. Naturforsch. 35c, 945 - 951 (1980)

RENNENBERG, H. : Differences in the use of cysteine and glutathione as sulfur source in photoheterotrophic tobacco suspension cultures. Z. Pfanzenphysiol. 105, 31 - 40 (1981)

RENNENBERG, H. und P. FILNER : Stimulation of H_2S emission from pumkin leaves by inhibition of glutathione synthesis. Plant Physiol. 69, 766 - 770 (1982)

RENNENBERG, H.; J. SEKIJA; L.G. WILSON und P. FILNER : Evidence for an intracellular sulfur cycle in cucumber leaves. Planta 154, 516 - 524 (1982)

RENNENBERG, H. : Cysteine desulfhydrase activity in cucurbit plants : Stimulation by preincubation with L- or D-cysteine. Phytochem. 22, 1557 - 1560 (1983a)

RENNENBERG, H. : Role of O-acetylserine in hydrogen sulfide emission from pumpkin leaves in response to sulfate. Plant Physiol. 73, 560 - 565 (1983b)

RESSLER, C.; O. ABE; Y. KONDO; B. COTTRELL und K. ABE : Purification and characterization from Chromobacterium violaceum of an enzyme catalyzing the synthesis of γ-cyano-α-aminobutyric acid and thiocyanate Biochemistry 12, 5369 - 5377 (1973)

REUVENY, Z. und P. FILNER : Regulation of adenosine triphosphate sulfurylase in cultured tobacco cells. J. Biol. Chem. 252, 1858 - 1864 (1977)

REUVENY, Z.; D.K. DOUGALL und P.M. TRINITY : Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 6670 - 6672 (1980)

RHODES, D. und P. TRINITY : Effects of sulfur starvation on soluble nitrogen pools of tobacco XD cells . Plant research 79, MSU-SOE Plant Research. Lab., Michigan S. 79 (1979)

RIPPKA, R.; J. DERUELLES; J.B. WATERBURY; M. HERDMAN und R.Y. STANIER : Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111, 1 - 61 (1979)

RODGERS, P.B. und C.J. KNOWLES : Cyanide production and degradation during growth of Chromobacterium violaceum. J. Gen. Microbiol. 108, 261 - 267 (1978)

RODGERS, P.B. : Cyanide metabolism and ß-Cyanoalanine formation by washed, non-proliferating cultures of Chromobacterium violaceum: Studies with radiolabelled cyanide. J. Gen. Microbiol. 128, 2983 - 2989 (1982)

ROMANO, A.H. und W.J. NICKERSON : Cystine reductase of pea seeds and yeast. J. Biol. Chem. 208, 409 - 416 (1954)

RONZIO, R.A.; W.B. ROWE und A. MEISTER : Studies on the mechanism of inhibition of glutamine synthase by methionine sulfoximine. Biochemistry 8, 1066 - 1075 (1969)

ROSICHAN, J.L.; N.BLAKE; R. STALLARD; W.M. OWAIS; A. KLEINHOFS und R.A. NILAN : O-acetylserine (thiol)-lyase from barley converts sodium azide to a mutagenic metabolite. Biochim. Biophys. Acta 748, 367 - 373 (1983).

ROWELL, P.; M.J.M. SAMPAIO; J.K. LA HA und W.D.P. STEWART : Alternation of cyanobacterial glutamine synthase activity in vivo response to light and NH_4^+ . Arch. Microbiol. 120, 195 - 200 (1979)

RUHEMANN, S. : CLXX. -Triketohydrindene hydrate. Part. V. The analogues of uramil and purpuric acid. J. Chem. Soc. 99, 1486 - 1492 (1911)

SAITO, S. : Sulfur requirement of Gonium (Volvocaceae). Plant Cell Physiol. 17, 407 - 410 (1976)

SAKAI, T.; H. YANASE; M. SAWADA und K. TONOMURA : Formation of ß-cyanoalanine by cyanide-resistant strain Enterobacter sp. IO-1. Agric. Biol. Chem. 45, 2053 - 2062 (1981)

SAKURAI, H.; S. LIEN und A.SAN PIETRO : Determination of acid-labile sulfide and zero-valence sulfur in subchloroplast particles in the presence of sodium dodecyl sulfate. Anal. Biochem. 119, 372 - 377 (1982)

SAUER, N.; E. KOMOR und W. TANNER : Regulation and charcterization of two inducible amino-acid transport systems in Chlorella vulgaris. Planta 159, 404 - 410 (1983)

SAWHNEY, S.K. und D.J.D. NICHOLAS : Activation of sulphate in Anabaena cylindrica. Planta 132, 189 - 195 (1976)

SAZ, A.K. und L.W. BROWNELL : D-cysteine desulfhydrase in Escherichia coli. Arch. Biochem. Biophys. 52, 291 - 293 (1954)

SCHEDEL, M. : Untersuchungen zur anaeroben Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen durch Thiobacillus denitrificans, Chromatium vinosum und Chlorobium limicola. Doktorarbeit, Bonn (1977)

SCHLÖSSER, U.G. : Sammlung von Algenkulturen. Ber. Deut. Bot. Ges. 95, 181 - 276 (1982)

SCHMIDT, A. Über Teilreaktionen der photosynthetischen Sulfatreduktion in zellfreien Systemen aus Spinat-chloroplasten und Chlorella. Z. Naturforsch. 27b, 183 - 192 (1968)

SCHMIDT, A. : On the mechanism of photosynthetic sulfate reduction. An APS-sulfotransferase from Chlorella Arch. Mikrobiol. 84, 77 - 86 (1972)

SCHMIDT, A. : Sulfate reduction in a cell-free system of Chlorella. The ferredoxin dependent reduction of a protein-bound intermediate by a thiosulfonate reductase. Arch. Mikrobiol. 93, 29 - 52 (1973)

SCHMIDT, A.; W.R. ABRAMS und J.A. SCHIFF : Reduction of adenosine 5'-phosphosulfate to cysteine in extracts from Chlorella and mutants blocked for sulfate reduction. Eur. J. Biochem. 47, 423 - 434 (1974)

SCHMIDT, A. : A sulfotransferase from spinach leaves using adenosine-5'-phosphosulfate. Planta 124, 267 - 275 (1975a)

SCHMIDT, A. : Inhibition of the adenosine-5'-phosphosulfate-sulfotransferase activity from spinach, maize and Chlorella by adenosine-5'-monophosphate. Planta 127, 93 - 95 (1975b)

SCHMIDT, A. : The adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase from spinach (Spinacea oleracea L.:). Stabilization, partial purification, and properties. Planta 130, 257 - 263 (1976)

SCHMIDT, A. : Protein-catalyzed isotopic exchange reaction between cysteine and sulfide in spinach leaves. Z. Naturforsch. 32c, 219 - 225 (1977a)

SCHMIDT, A. : Exchange of cysteine-bound sulfide with free sulfide and cysteine synthase activity in Chlorella pyrenoidosa. Z. Pflanzenphysiol. 84, 435 - 446 (1977b)

SCHMIDT, A. : Photosynthetic assimilation of sulfur compounds. In: "Encyclopedia of Plant Physiology" M. Gibbs und E. Latzko (eds.) Vol. 6 Photosynthesis II., S. 481 - 496, Springer Verlag, Berlin 1979

SCHMIDT, A. : Isolation of two thioredoxins from the cyanobacterium Synechococcus 6301. Arch. Microbiol. 127, 259 - 265 (1980)

SCHMIDT, A. : A thioredoxin activated glutamine synthetase in Chlorella. Z. Naturforsch. 36c, 396 - 399 (1981)

SCHMIDT, A.; I. ERDLE und H.-P. KOST : Changes of C-phycocyanin in Synechococcus 6301 in relation to groth on various sulfur compounds. Z. Naturforsch. 37c, 870 - 876 (1982)

SCHMIDT, A. : Regulation of assimilatory nitrate- and sulfate reduction by thioredoxins. In "Thioredoxins structure and function" P. Gadal (ed.), Editions du centre national de la recherche scientifique. Paris, 307/7, 1983

SCHMIDT, A. und I. ERDLE : A cysteine desulfhydrase specific for D-cysteine from the green alga Chlorella fusca. Z. Naturforsch. 38c, 428 - 435 (1983)

SCHMIDT, A. und E. KRÄMER : A membrane bound cysteine oxydase from the cyanobacterium Synechococcus 6301. Z. Naturforsch. 38c, 446 - 450 (1983)

SCHMIDT, A. : Occurence of mercaptopyruvate sulfotransferase activity in photosynthetic organisms. Z. Naturforsch. 39c, 916 - 921 (1984)

SCHMIDT, A.; I. ERDLE und B. GAMON : Isolation and characterization of thiosulfate reductase from the green alga Chlorella fusca. Planta 162, 243 - 249 (1984)

SCHMIDT, G.L. und M.D. KAMEN : Variable cellular composition of Chromatium in growing cultures. Arch. Mikrobiol. 73, 1 - 18 (1970)

SCHMIDT, G.L.; G.L. NICHOLSEN und M.D. KAMEN : Composition of the sulfur particle of Chromatium vinosum strain D. J. Bacteriol. 105, 1137 - 1141 (1971)

SCHMIDT, M. : Zur Problematik der Schwefel-Schwefel- Bindung. Österreichische Chemiker Zeitung 64, 236 - 246 (1963)

SCHMIDT, M. : Reactions of the sulfur-sulfur bond. In "Elemental sulfur" B. Meyer (ed.) S. 301 - 320 Interscience, New York (1965)

SCHMUTZ, D. : Regulation der assimilatorischen Sulfatreduktion während der Ontogenese von Primärblättern von Phaseolus vulgaris L. Lizentiatsarbeit, Bern (1980)

SCHMUTZ, D. und C. BRUNOLD : Regulation of sulfate assimilation in plants. XIII. Assimilatory sulfate reduction during ontogenesis of primary leaves of Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol. 70, 524 - 527 (1982)

SCHMUTZ, D.; H.-R. WYSS und C. BRUNOLD : Activity of sulfate-assimilating enzymes in primary leaves of Phaseolus vulgaris L. during dark-induced senescence. Z. Planzenphysiol. 110, 211 - 219 (1983)

SCHMUTZ, D. und C. BRUNOLD : Intercellular localization of assimilatory sulfate reduction in leaves of Zea mays and Triticum aestivum. Plant Physiol. 74, 866 - 870 (1984)

SCHÖBERL, A. und T. HORNUNG : Über die Einwirkung von Alkalien auf Cystin und Cystinderivate. Ann. 534, 210 - 225 (1939)

SCHÖNBERG, A. und R. MOUBASHER : Studies on indanes derivatives. Part IV. synthesis of bis-1,3-diketoindanyline, and experiments with "ninhydrin" (Triketoindane hydrate). J. Chem. Soc. 1949, 212 - 214 (1949)

SCHÖNBERG, A. und E. SINGER : Die Chemie des Ninhydrins und anderer cyclischer 1,2,3-Tricarbonylverbindungen. Tetrahedron 34, 1285 - 1300 (1978)

SCHUBERT, M. : Complex types involved in the catalytic oxidation of thiol acids. J. Am. Chem. Soc. 54, 4077 - 4085 (1932)

SCHWARTZ, H.M.; S.L. BIEDRON; M.M. von HOLDT und S. REHM : A study of some plant esterases. Phytochem. 3, 189 - 200 (1964)

SCHWENN, J.D. und H.H. HENNIES : Enzymes and bound intermediate involved in photosynthetic sulfate reduction of spinach chloroplast and Chlorella. In "Proceedings of the third Internat. Congr. on photosynthesis" M. Avron (ed.), S. 629 - 635, Elsevier, Amsterdam 1974

SCHWENN, J.D. und B. DEPKA : Assimilatory sulfate reduction by chloroplasts: The regulatory influence of adenosine-mono- and adenosine-diphosphate.Z. Naturforsch. 33c, 729 - 797 (1977)

SCHWENN, J.D.; E. EL-SHAGI; A. KEMENA und E. PETRAK : On the role of S-sulfotransferase in assimilatory sulfate reduction by plant cell suspension cultures. Planta 144, 419 - 425 (1979)

SCHWENN, J.D.; U. SCHRIEK und H. KILTZ : Dissimilation of methionine in cell suspension cultures from Catharanthus roseus L. Planta 158, 540 - 549 (1983)

SCHWENN, J.D. und A. KEMENA : Expression of the plant sulphite reductase in cell suspension cultures from Catharanthus roseus L. Planta 160, 151 - 158 (1984)

SCHWENN, J.D. und U. SCHRIEK : A new role for thioredoxin in assimilatory sulphate reduction. Activation of the adenylsulphate kinase from the green alga Chlamydomonas reinhardii CW 15. FEBS Letters 170, 76 - 80 (1984)

SEDMAK, J.J. und S.E. GROSSBERG : A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G 250. Anal. Biochem. 79, 544 - 552 (1977)

SEGAL, S. und J.C. CRAWHALL : Characteristics of cystine and cysteine transport in rat kidney cortex slices. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 231 - 237 (1968)

SEGEL, I.H. und M.J. JOHNSON : Synthesis and characterization of sodium cysteine-S-sulfate monohydrate. Anal. Biochem. 5, 330 - 337 (1963)

SEKIYA, J.; A. SCHMIDT; H. RENNENBERG; L.G. WILSON und P. FILNER : Hydrogen sulfide emission by cucumber leaves in response to sulfate in light and dark. Phytochem. 21, 2173 - 2178 (1982a)

SEKIYA, J.; A. SCHMIDT; L.G. WILSON und P. FILNER : Emission of hydrogen sulfide by leaf tissue in response to L-cysteine. Plant Physiol. 70, 430 - 436 (1982b)

SHEEHAN, J.C. und D.H. YANG : A new synthesis of cysteinyl peptides. J. Am. Chem. Soc. 80, 1158 - 1164 (1958)

SHILO, M.; A. OREN und D. FRIEDBERG : Metabolic flexibility of Cyanobacteria as a strategy for growth in fluctuating enviroment. Abstracts of the third international symposium on photosynthetic prokaryotes. J.M. Nichols (ed.) University of Liverpool, A 27, Oxford, 1979

SHINOHARA, K. und M. KILPATRICK : The stability of cystine in acid solution. J. Biol. Chem. 105, 241 - 250 (1934)

SIEGEL, L.M. : A direct microdetermination for sulfide. Anal. Biochem. 11, 126 - 132 (1965)

SKYE, G.E. und I.H. SEGEL : Independent regulation of cysteine and cystine transport in Penicillum chrysogenum. Arch. Biochem. Biophys. 138, 306 - 318 (1970)

SMITH, I.K.und J.F. THOMPSON : Purification and characterization of L-serine transacetylase and O-acetyl-L-serine sulfhydrolase from kidney bean seedlings (Phaseolus vulgaris). Biochim. Biophys. Acta 227, 288 - 295 (1971)

SMITH, I.K. : Studies of L-cysteine biosynthetic enzymes in Phaseolus vulgaris L.. Plant Physiol. 50, 477 - 479 (1972)

SMITH, I.K. : Sulfate transport in cultured tobacco cells. Plant Physiol. 55, 303 - 307 (1975)

SMITH, I.K. : Characterization of sulfate transport in cultured tobacco cells. Plant Physiol. 58, 358 - 362 (1976)

SMITH, I.K. : Evidence for O-actylserine in Nicotiana tabacum. Phytochem. 16, 1293 - 1294 (1977)

SMITH, I.K. : Regulation of sulfate assimilation in tobacco cells. Plant Physiol. 66, 877 - 883 (1980)

SMITH, I.K. : Compartmentation of sulfur metabolites in tobacco cells. Plant Physiol. 68, 937 - 940 (1981)

SMYTHE, D.G.; A. NAGAMATSU und J.S. FRUTON : Some reactions of N-ethylmaleimide. J. Am. Chem. Soc. 82, 4600 - 4604 (1960)

SODA, K. : Synthesis of D-cysteine by a new pyridoxal enzyme. TIBS 5, 152 - 153 (1983)

SÖRBO, B. : A colorimetric method for the determination of thiosulfate. Biochim. Biophys. Acta 23, 412 - 416 (1957a)

SORBO, B. : Enzymic transfer of sulfur from mercaptopyruvate to sulfite or sulfinates. Biochim. Biophys. Acta 24, 324 - 329 (1957b)

SOLDATINI, G.F.; I. ZIEGLER und H. ZIEGLER : Sulfite: Preferantial sulfur source and modifier of CO_2 fixation in Chlorella vulgaris. Planta 143, 225 - 231 (1978)

SPEDDING, D.J.; I. ZIEGLER; R. HAMPP und H. ZIEGLER : Effects of pH on the uptake of ^{35}S-sulfur from sulfate, sulfite, and sulfide by Chlorella vulgaris. Z. Pflanzenphysiol. 97, 205 - 214 (1980a)

SPEDDING, D.J.; I. ZIEGLER; R. HAMPP und H. ZIEGLER : Effects of pH on the uptake of ^{35}S-sulfur from sulfate, sulfite, and sulfide by isolated spinach chloroplasts. Z. Pflanzenphysiol. 96, 351 - 364 (1980b)

STANIER, R.Y.; R. KUNISAWA; M. MANDEL und G. COHEN-BAZIRE : Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). Bacteriol. Rev. 35, 171 - 205 (1971)

STEUDEL, R. : Molekulare Zusammensetzung von flüssigem Schwefel. Teil 1 : Kritische Literaturübersicht. Z. anorg. allg. Chem. 478, 139 - 155 (1981)

STEUDEL, R. und D. ROSENBAUER : Separation of cyclic sulphur-nitrogen compounds by high-performance liquid chromatography. LXXVIII. J. Chromatogr. 216, 399 - 401 (1981)

STEWART, G.R. und D. RHODES : Evidence for the assimilation of ammonia via the glutamine pathway in nitrate-grown Lemna minor L. FEBS Letters 64, 296 - 299 (1976)

STULEN, I.; G.F. ISRAELSTAM und A. OAKS : Enzymes of asparagine synthesis in maize roots. Planta 146, 237 - 241 (1979)

SULLIVAN, M.X. und W.C. HESS : The determination of cystine in urine. J. Biol. Chem. 116, 221 - 232 (1936)

SULLIVAN, M.X.; W.C. HESS und H.W. HOWARD : The quantitative estimation of both cystine and cysteine in mixtures. J. Biol. Chem. 145, 621 - 624 (1942)

SUZUKI, I. : Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of Thiobacillus thiooxidans. Biochim. Biophys. Acta 104, 359 - 371 (1965)

SZCZEPKOWSKI, T.W. und J.L. WOOD : The cystathionase-rhodanese system. Biochim. Biophys. Acta 139, 469 - 478 (1967)

TAGER, J.M. und N. RAUTANEN : Sulphite oxidation by a plant mitochondria system. Enzymic and non-enzymic oxidation. Physiol. Plant. 9, 665 - 673 (1956)

TAKAHASHI, M.; M. RAKANO und K. ASADA : Tris-induced cross-linking of thylakoid peptides; thiol oxidation catalyzed by Tris-Cu^{2+} complexes as a possible mechanism. J. Biochem. 90, 87 - 94 (1981)

TAMURA, G.; T. IWASAWA; M. MASADA und K. FUKUSHIMA : Some properties of cysteine synthase from radish roots. Agric. Biol. Chem. 40, 637 - 638 (1976)

TANIGUCHI, T. und T. KIMURA : Role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the formation of the iron-sulfur chromophore of adrenal ferredoxin. Biochim. Biophys. Acta 364, 284 - 295 (1974)

THOMPSON, G.A.; A.H. DATKO; S.H. MUDD und J. GIOVANELLI : Methionine biosynthesis in Lemna. Plant Physiol. 69, 1077 - 1083 (1982)

THOMPSON, J.F. und D.P. MOORE : Enzymatic synthesis of cysteine and S-methylcysteine in plant extracts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 281 - 287 (1968)

TIETZE, F.; K.H. BRADLEY und J.D. SCHULMAN : Enzymatic reduction of cystine by subcellular fractions of cultured and peripheral leucocytes from normal and cysteinotic individuals. Pediat. Res. 6, 649 - 658 (1972)

TISCHNER, R. und A. HÜTTERMANN : Regulation of glutamine synthetase by light and during nitrogen deficiency in synchronous Chlorella sorokiniana. Plant Physiol. 66, 805 - 808 (1980)

TISCHNER, R. und A. SCHMIDT : A thioredoxin-mediated activation of glutamine synthase and glutamate synthase in synchronous Chlorella sorokiniana. Plant Physiol. 70, 113 - 116 (1982)

TISCHNER, R. und A. SCHMIDT : Light mediated regulation of nitrate assimilation in Synechococcus leopoliensis. Arch. Microbiol. 137, 151 - 154 (1984)

TISHEL, M. und M. MAZELIS : Enzymatic degradation of L-cystine by cytoplasmic particles from cabbage leaves. Nature 211, 745 - 746 (1966)

TRINITY, P.; C. VAN ARB und A. SCHMIDT : Regulation of APS sulfotransferase in tobacco XD cells by reduced sulfur. Plant research 79, MSU-SOE Plant Research. Lab. Michigan S.77 (1979)

TROLL, W. und R.K. CANNAN : A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. J. Biol. Chem. 200, 803 - 811 (1953)

TRÜPER, H.G. : Sulfur metabolism in Thiorhodaceae. II. Stoichiometric relationship of CO_2 fixation to oxidation of hydrogen sulfide and intracellular sulfur in Chromatium okenii. Antonie v. Leeuwenhoek 30, 385 - 394 (1964)

TRÜPER, H.G. und J.C. HATHAWAY : Orthorhombic sulphur formed by photosynthetic sulphur bacteria. Nature 215, 435 - 436 (1967)

TRUPER, H.G. : Ectothiorhodospira mobilis Pelsh, a photosynthetic sulfur bacterium depositing sulfur outside the cells. J. Bacteriol. 95, 1910 - 1920 (1968)

TRÜPER, H.G. : Photolithotrophic sulfur oxidation. In "Biology of inorganic nitrogen and sulfur". H. Bothe und A. Trebst (eds.) , S. 199 - 211, Springer-Verlag, Berlin 1981

TRÜPER, H.G. : The present state of knowledge of sulfur metabolism in phototrophic bacteria. IV. International Symposium of photosynthetic prokaryotes. B 57 Bombannes-Bordeaux, France (1982)

TSAI, M.-D.; J. WEAVER; H.G. FLOSS; E.E. CONN; R.K. CREVELING und M. MAZELIS : Stereochemistry of the ß-cyanoalanine synthetase and S-alkylcysteine lyase reactions. Arch. Biochem. Biophys. 190, 553-559 (1978)

TSANG, M.L.-S. und J.A. SCHIFF : Studies of sulfate utilisation by algae 17. Reactions of the adenosine-5'-phosphosulfate (APS) sulfotransferase from Chlorella and studies of model reactions wich explain the diversity of side product with thiols. Plant Cell Physiol. 17, 1209 - 1220 (1976)

UBUKA, T. und K. YAO : Oxidative deamination of L-cysteine by L-amino acid oxidase from snake venom: formation of S-(2-oxo-2-carboxyethylthio)cysteine and S-carboxymethylthiocysteine. Biochem Biophys. Res. Commun. 55, 1305 - 1310 (1973)

UBUKA, T.; Y. ISHIMOTO und K. KASAHARA : Determination of 3-mercaptopyruvate-cysteine disulfide, a product of oxidative deamination of L-cystine by L-amino acid oxidase. Anal. Biochem. 67, 66 - 73 (1975)

UBUKA, T.; S. UMEMURA; S. YUASA; M. KINUTA und K. WATANABE : Purification and characterization of mitochondrial cysteine aminotransferase from rat liver. Physiol. Chem. Phys. 10, 483 - 500 (1978)

UBUKA, T.; S. UYASA; M. KINUTA und R. AKAGI : Production of S-sulfocysteine from so-called cystine disulfoxide in the presence of aspartate aminotransferase. Physiol. Chem. Phys. 11, 353 - 357 (1979)

UBUKA, T.; M. KINUTA; R. AKAGI und S. KIGUCHI : Separation of S-sulfocysteine and related compounds by anion-exchange chromatography and electrophoresis. J. Chromatogr. 188, 442 - 444 (1980a)

UBUKA, T.; S. YUASA; M. KINUTA und R.AKAGI : Structure of so-called cystine disulfoxide. Physiol. Chem. Phys. 12, 45 - 49 (1980b)

UBUKA, T.; R. AKAGI; S. KIGUCHI; M. TANIGUCHI und H. MIKAMI : Biosynthesis of S-(2-hydroxy-2-carboxyethylthio)-L-cysteine (3-mercaptolactate-cystine-disulfide) by the rat heart. Biochem. Internat. 6, 291 - 296 (1983)

UTHEG, L.C. und J. WESTLEY : Purification and steady-state kinetic analysis of Yeast thiosulfate reductase. Arch. Biochem. Biophys. 195, 211 - 222 (1979)

UREN, J.R.; R. RAGIN und M. CHAYKOVSKY : Modulation of cysteine metabolism in mice. Effects of propargylglycine and L-cyst(e)ine-degrading enzymes. Biochem. Pharmacol. 27, 2807 - 2814 (1978)

URLAUB, H. und G. JANKOWSKI : Sulfate reduction in Catharanthus roseus (L). Identification and subcellular localization of a particulate adenosine-5'-phosphosulfate-reducing activity in cells from cell suspension cultures. Planta 155, 154 - 161 (1982)

UTKILEN, H.C.; M. HELDAL und G. KNUTSEN : Characterization of sulphate uptake in Anacystis nidulans. Physiol. Plant. 38, 217 - 220 (1976)

VACHEK, J. : Polarographic and photometric estimation of 6-mercaptopurine. Cesk. Farm. 9, 126 - 129 (1960)

VACHEK, H. und J.L. WOOD : Purification and properties of mercaptopyruvate sulfurtransferase of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 258, 133 - 146 (1972)

VALLEE, M. und R. JEANJEAN : Le système de transport de SO_4^{2-} chez Chlorella pyrenoidosa et sa regulation. I. Etude cinétique de la perméation. Biochim. Biophys. Acta 150, 599 - 606 (1968a)

VALLEE, M. und R. JEANJEAN : Le système de transport de SO_4^{2-} chez Chlorella pyrenoidosa et sa regulation. II. Recherches sur la regulation de l'entée. Biochim. Biophys. Acta 150, 607 - 617 (1968b)

VAN ARB, C. und C. BRUNOLD : Analysis of the regulation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase activity in Lemna minor L. using ^{15}N-density labeling. Planta 149, 355 - 360 (1980)

VAN GEMERDEN, H. : On the ATP generation by Chromatium in darkness. Arch. Mikrobiol. 64, 118 - 124 (1968)

VAN GEMERDEN, H. und H.H. BEEFTNINK : Coexistence of Chlorobium and Chromatium in a sulfide-limited continuous culture. Arch. Mikrobiol. 129, 32 - 34 (1981)

VAN NIEL, C.B. : On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria. Arch. Microbiol. 3, 1 - 112 (1931)

VAN NIEL, C.B. : On the metabolism of the Thiorhodaceae. Arch. Microbiol. 7, 323 - 358 (1936)

VAN SLYKE, D.D.; R.T. DILLON; D.A. MacFAYDEN und P.HAMILTON : Gasometric determination of carboxyl groups in free amino acids. J. Biol. Chem. 141, 627 - 669 (1941)

VENNESLAND, B. : HCN and the control of nitrate reduction. The regulation of the amount of active nitrate reductase present in Chlorella cells. In "Biology of inorganic nitrogen and sulfur". H. Bothe und A. Trebst (eds.) S. 233 - 243 Springer Verlag, Berlin 1981

VICENTE, M. und J.L. CANOVAS : Regulation of the glucolytic enzymes in Pseudomonas putida. Arch. Mikrobiol. 93, 53 - 64 (1973)

VOLINI, M. und K. ALEXANDER : Multiple forms and multiple functions of the rhodanese. In "Cyanide in Biology" B. Vennesland; E.E. Conn; C.J. Knowles; J. Westley und F. Wissing (eds.) S. 61 - 76 , Academic Press, New York 1981

WEISBROD, R.E. und A. MEISTER : Studies on glutamine-synthetase from Escherichia coli. Formation of pyrrolidon carboxylate and inhibition by L-methionine sulfoximine. J. Biol. Chem. 248, 3997 - 4002 (1973)

WEITZ, E.; K. GIELES; J. SINGER und B. ALT : Über höhere Polythiosäuren. V. Mitteil. : Über die Polythionat-Natur der hydrophilen Odénschen Schwefelsole. Chem. Ber. 89, 2365 - 2374 (1956)

WEITZMAN, P.D.J. : A critical reexamination of the reaction of sulfite with DTNB. Anal. Biochem. 64, 628 - 630 (1975)

WELD, J.T. : The antibiotic action of Tillandsia usneoides (Spanish moss). Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 59, 40 - 41 (1945)

WENCK, H.; E. SCHWABE; F. SCHNEIDER und L. FLOHÉ : Vergleichende Untersuchungen einiger physikalisch-chemischer Verfahren zur quantitativen Analyse von SH-Verbindungen verschiedener Struktur. Z. Anal. Chem. 258, 267 - 272 (1972)

WENG, L.; J. RUSSELL und L. HEINRIKSON : The covalent structure of bovine liver rhodanese. J. Biol. Chem. 253, 8093 - 8101 (1962)

WHITAKER, J.R. : Ninhydrin assay in the presence of thiol compounds. Nature 189, 662 - 663 (1961)

WHITED, G.M. und J.H. TUTTLE : Separation and distribution of thiosulfate-oxidizing enzyme, tetrathionate reductase, and thiosulfate reductase in extracts of marine heterotroph strain 16 B. J. Bacteriol. 156, 600 - 610 (1983)

WIDER, de XIFERA, E.A.; J.D. SANDY; R.C. DAVIES und A. NEUBERGER, F.R.S. : Control of 5-aminolaevulinate synthetase activity in Rhodopseudomonas sphaeroides. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 273, 79 - 98 (1976)

WIELAND, T. und H. HORNIG : S-Acylspaltung bei S-Acetyl-ω-aminomercaptanen verschiedener Kettenlänge. Liebigs Ann. 600, 12 - 22 (1956)

WINOGRADSKY, S.N. : Über Schwefelbakterien. Bot. Ztg. 45, 489 - 508 (1887)

WIUM-ANDERSEN, S.; U. ANTHONI und G. HOUEN : Elemental sulphur, a possible allelopathic compound from Ceratophyllum demersum. Phytochem. 22, 2613 (1983)

WOODIN, T.S. und I.H. SEGEL : Glutathione reductase-dependent metabolism of cysteine-S-sulfate by Penicillium chrysogenum. Biochim. Biophys. Acta 167, 78 - 88 (1968)

WORK, E. : Reaction of ninhydrin in acid solution with straight chain amino acids containing two amino groups and its application to the estimation of αε-diaminopimelic acid. Biochem. J. 67, 416 - 423 (1957)

WRATTEN, S.J. und D.J. FAULKNER : Cyclic polysulfides from the red alga Chondria californica. J. Org. Chem. 41, 2465 - 2467 (1976)

WYSS, H.-R. und C. BRUNOLD : Regulation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase activity by H_2S and cyst(e)ine in primary leaves of Phaseolus vulgaris L. Planta 147, 37 - 42 (1979)

WYSS, H.-R. und C. BRUNOLD : Regulation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase by sulfur dioxide in primary leaves of beans (Phaseolus vulgaris). Physiol. Plant. 50, 161 - 165 (1980)

YAMAGATA, S.; K. TAKESHIMA und N. NAIKI : Evidence for the identity of O-acetylserine sulfhydrylase with O-acetylhomoserine sulfhydrylase in yeast. J. Biochem. 75, 1221 - 1229 (1974)

YAMAGATA, S.; K. TAKESHIMA und N. NAIKI : O-acetylserine and O-acetylhomoserine sulfhydrylase of yeast : Studies with methionine auxotrophs. J. Biochem. 77, 1029 - 1036 (1975)

YAMAGATA, S. : O-acetylserine- and O-acetylhomoserinesulfhydrolase of yeast. Subunit structure. J. Biochem. 80, 787 - 797 (1976)

YAMAGATA, S. Occurence of low molecular weight O-acetylserine sulfhydrylase in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J. Biochem. 88, 1419 - 1423 (1980)

YAMAGATA, S. : Low molecular weight O-acetylserinesulfhydrylase and serinesulfhydrylase of Saccharomyces cerevisiae are the same protein. J. Bacteriol. 147, 688 - 690 (1981)

YANASE, H.; T. SAKAI und K. TONOMURA : Purification and crystallization of a ß-cyanoalanine-forming enzyme from Enterobacter sp. 10-1. Agric. Biol. Chem. 46, 355 - 361 (1982a)

YANASE, H.; T. SAKAI und K. TONOMURA : Some properties of a ß-cyanoalanine-forming enzyme of Enterobacter sp. 10-1. Agric. Biol. Chem. 46, 363 - 369 (1982b)

YU, E.K. und I.W. DeVOE : L-cysteine oxidase activity in the membrane of Neisseria meningitidis. J. Bacteriol. 145, 280 - 287 (1981)

Lebenslauf

26.11.1952	Geburt in Göttingen
1959 - 1963	Volksschule in München
1963 - 1969	neusprachliches Gymnasium in München
1969 - 1973	mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in München
8.6.1973	Abitur
1973 - 1978	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Feb. 1977	Diplomhauptprüfung Hauptfach Botanik, Nebenfächer Mikrobiologie und Biochemie
1976 - 1978	Diplomarbeit bei Prof. Dr. A. Schmidt am Botanischen Institut der Universität München "Adenosin-5'-phosphosulfat umsetzende Enzyme bei Chlamydomonas reinhardtii CW 15."
1978 - 1980	wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. H.J. Gross am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried "Untersuchungen zum Einfluß von Viroiden auf den Stoffwechsel infizierter Pflanzen"
1980 - 1984	Dissertation bei Prof. Dr. A. Schmidt am Botanischen Institut der Universität München "Funktion, Eigenschaften und Regulation der multifunktionalen Cysteinsynthase und einiger am Cysteinstoffwechsel beteiligter Enzyme beim Wachstum von Chlorella fusca auf verschiedenen schwefelhaltigen Verbindungen."